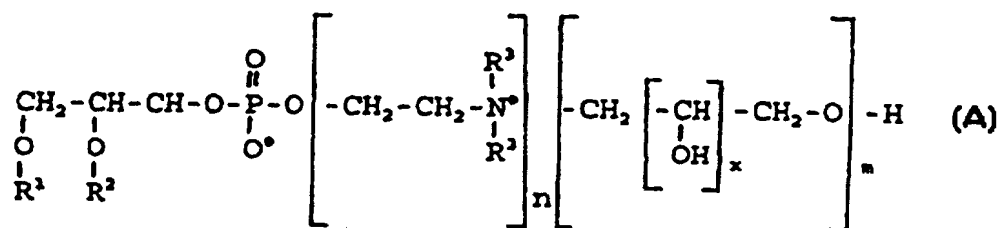



 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07F 9/10, A61K 9/127, C07D 317/22, C07C 43/13		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/30058
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. August 1997 (21.08.97)	
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00749		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Februar 1997 (17.02.97)			
(30) Prioritätsdaten: 196 05 833.3 16. Februar 1996 (16.02.96) DE 196 22 224.9 3. Juni 1996 (03.06.96) DE		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Mit geänderten Ansprüchen.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX- PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIBL, Hans-Jörg [DE/DE]; Heinrich-Deppe-Ring 22, D-37120 Bovenden (DE).			
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D- 81679 München (DE).			

(54) Title: PHOSPHATIDYL OLIGOGLYCEROLS

(54) Bezeichnung: PHOSPHATIDYLOLIGOGLYCERINE



(57) Abstract

The invention concerns specific compounds of general formula (A) which are used to form liposomes with an extended half-life value in blood.

(57) Zusammenfassung

Zur Bildung von Liposomen mit verlängerter Halbwertszeit in Blut werden definierte Verbindungen der allgemeinen Formel (A) eingesetzt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Phosphatidyloligoglycerine

Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft Phosphatidylverbindungen, die einen definierten hydrophilen Rest enthalten, sowie Liposomen, die eine verlängerte Lebensdauer aufweisen.

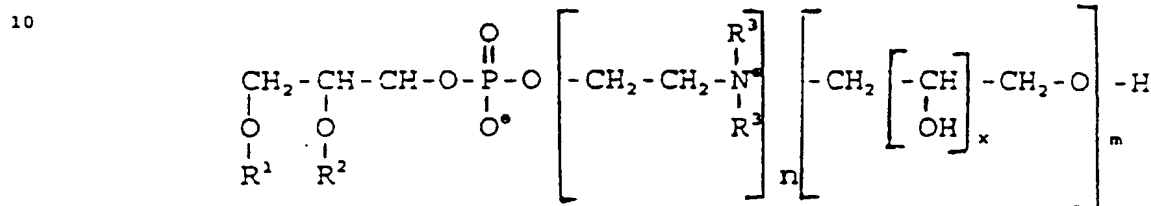
Herkömmliche Liposome weisen im Serum eine Verweilzeit von bis
10 zu 5 Stunden auf. Insbesondere bei der Verwendung von Liposomen als Träger für pharmazeutische Wirkstoffe ist jedoch eine möglichst lange Verweilzeit von Liposomen im Blutkreislauf wünschenswert.

- 15 Es wurden daraufhin die sogenannten "Stealth-Liposomen" entwickelt, die eine verlängerte Lebensdauer aufweisen. Diese "Stealth-Liposomen" sind auf der Basis von Phosphatidylverbindungen aufgebaut, die einen verlängerten Polyethylenglykolrest enthalten. Der Polyethylenglykolrest erwies sich für die
20 angestrebte verlängerte Lebensdauer am wirksamsten bei Molekulargewichten zwischen 2000 und 3000. Ein wesentlicher Nachteil dieser "Stealth-Liposomen" bzw. der Phosphatidylverbindungen mit Polyethylenglykolrest liegt allerdings darin, daß es sich nicht um exakt definierte Verbindungen handelt, da die Poly-
25 ethylenglykolreste unterschiedliche Kettenlängen aufweisen.

Weiterhin wurde von Maruyama et al. (Int. J. Pharmac. 111 (1994), 103-107) die Verwendung von Dipalmitoylphosphatidylpolyglycerinen zur Verlängerung der Liposomenzirkulation vorge-
30 schlagen. Da jedoch von technischen Polyglycerinen ausgegangen wurde, wurden auch hier keine einheitlichen Produkte erhalten. Die technischen Polyglycerine, die aus einem Gemisch aus Polyglycerinen verschiedener Kettenlänge und Monoglycerin bestehen und durch ihr mittleres Molekulargewicht charakterisiert sind,
35 wurden mittels Phospholipase D phosphatidyliert. Mit den so erhaltenen Produkten konnte jedoch nur eine geringe Erhöhung der Lebensdauer von Liposomen in Blut beobachtet werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war deshalb die Bereitstellung von Verbindungen, die die Lebensdauer von Liposomen erhöhen und zugleich eine exakt angebbare Zusammensetzung aufweisen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine Verbindung einer allgemeinen Formel (A)



worin R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff, einen gesättigten oder ungesättigten Alkyl- oder Acylrest darstellen, der gegebenenfalls verzweigt oder/und substituiert sein kann, R^3 Wasserstoff oder einen Alkylrest darstellt,

$n = 0$ oder 1 ist,

x eine ganze Zahl von 1 bis 4 darstellt und

m eine ganze Zahl von 2 bis 10 , falls $n = 0$, oder eine ganze Zahl von 1 bis 10 , falls $n = 1$, darstellt sowie 1 ist, falls x größer als 1 ist,

wobei im Falle $n = 0$ die Verbindung hinsichtlich des Werts von m größer als 90% einheitlich ist.

Der dieser Erfindung zugrundeliegende schrittweise Aufbau der hydrophilen Reste der Phosphatidylverbindungen der Formel (A) ermöglicht es, eine genau definierte Zusammensetzung der Verbindungen zu erhalten.

Es handelt sich also bei der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel (A) nicht um ein Gemisch verschiedener Moleküle unbestimmter Zusammensetzung und Kettenlänge, sondern es kann gezielt eine gewünschte Struktur erhalten werden. Dies bedeutet, daß beispielsweise, falls das gewünschte Produkt ein Triglycerinderivat ist, also $x = 1$ und $m = 3$ in Formel (A),

der Gehalt an Monoglycerin-, Diglycerin-, Tetraglycerin- und höheren Oligoglycerinderivaten gering ist. Bevorzugt wird ein Glycerinderivat bestimmter Kettenlänge im wesentlichen frei von Glycerinderivaten anderer Kettenlänge erhalten. Insbesondere ist der Gehalt an Monoglycerinderivaten gering und beträgt weniger als 5 %, bevorzugt weniger als 1 % und besonders bevorzugt weniger als 0,1 %, bezogen auf das gewünschte Oligoglycerinderivat.

Erfindungsgemäß stellt die Verbindung der Formel (A) eine einheitliche Verbindung definierter Struktur dar. Bevorzugt ist die Verbindung hinsichtlich des Werts von m größer als 95 %, besonders bevorzugt größer als 99 % einheitlich. Es ist jedoch auch möglich, die Verbindung mit einer Einheitlichkeit von mehr als 99,9 % hinsichtlich des Werts von m bereitzustellen.

Bevorzugt handelt es sich bei der Verbindung um Oligoglycerinderivate mit 2 bis 5 Glycerineinheiten, bevorzugt mit 2 bis 4 Glycerineinheiten. Es handelt sich dabei bevorzugt um 1.3-verknüpfte lineare Oligoglycerinreste.

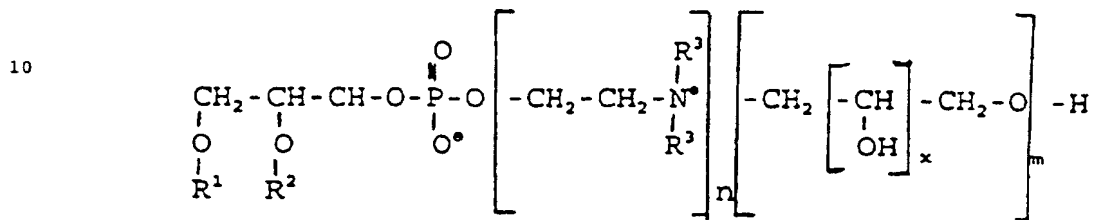
Die Reste R^1 und R^2 stellen erfindungsgemäß bevorzugt unabhängig voneinander Wasserstoff, einen gesättigten oder ungesättigten C_1 - C_{24} -Alkyl- oder C_1 - C_{24} -Acylrest, bevorzugt Wasserstoff oder einen gesättigten oder ungesättigten C_8 - C_{24} -Alkyl- oder C_8 - C_{24} -Acylrest dar, wobei bevorzugt mindestens einer der Reste R^1 und R^2 einen Acylrest darstellt.

Der Rest R^3 stellt bevorzugt Wasserstoff oder einen Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen dar.

Die Verbindung der Formel (A) kann als Racemat, das eine Phospho-rac-(1 oder 3)-oligoglycerinverknüpfung enthält oder als stereospezifisches Isomer vorliegen. Die Stereoisomere können eine Phospho-sn-1-oligoglycerinverknüpfung oder eine Phospho-sn-3-oligoglycerinverknüpfung aufweisen. Die Bildung der stereospezifischen Verknüpfung kann analog zu den in der Literatur beschriebenen Verfahren durchgeführt werden (DE 31 30

867 A1; H. Eibl et al., Chem. Phys. Lipids, 28 (1981), 1- 5, 41 (1986), 53-63 und 47 (1988, 47-53).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Liposomen, die Phospholipide oder/und Alkylphospholipide, gegebenenfalls Cholesterin und 1 bis 50 Mol-% einer Verbindung der allgemeinen Formel (A)



oder deren Salze enthalten, wobei das Cholesterin, die Phospholipide, die Alkylphospholipide und die Verbindung der Formel (A) zusammen 100 Mol-% ergeben, worin R¹ und R² unabhängig voneinander Wasserstoff, einen gesättigten oder ungesättigten Alkyl- oder Acylrest darstellen, der gegebenenfalls verzweigt oder/und substituiert sein kann,

R³ Wasserstoff oder einen Alkylrest darstellt,

n = 0 oder 1 ist,

x eine ganze Zahl von 1 bis 4 darstellt und

m eine ganze Zahl von 2 bis 10, falls n = 0, oder eine ganze Zahl von 1 bis 10, falls n = 1, darstellt sowie 1 ist, falls x größer als 1 ist, wobei im Falle n = 0 die Verbindung (A) hinsichtlich des Werts von m größer als 90 % einheitlich ist.

Die erfindungsgemäßen Liposomen weisen eine Halbwertszeit im Serum von bis zu 18 bis 20 Stunden auf. Dabei wurde überraschenderweise ein linearer Abfall der Liposomenkonzentration im Blut gefunden.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird die Verbindung (A) mit einer Einheitlichkeit von größer als 95 %, besonders bevorzugt größer als 99 % hinsichtlich des Werts von m verwendet. Es ist aber auch möglich, die Verbindung (A) in praktisch reiner Form

mit einer Einheitlichkeit von größer als 99,9 % hinsichtlich des Werts von m einzusetzen.

Bevorzugt enthalten die Liposomen eine Verbindung der Formel (A), in der $x = 1$ und m eine ganze Zahl von 2 bis 5, besonders bevorzugt eine ganze Zahl von 2 bis 4 darstellt.

Die Reste R^1 und R^2 der in den Liposomen enthaltenen Verbindung der Formel (A) können unabhängig voneinander Wasserstoff, einen gesättigten oder ungesättigten C_1 - C_{24} -Alkyl- oder C_1 - C_{24} -Acylrest, bevorzugt Wasserstoff oder einen gesättigten oder ungesättigten C_8 - C_{24} -Alkyl- oder C_8 - C_{24} -Acylrest darstellen. Bei dem Substituenten handelt es sich um einen Rest, der bei der Herstellung nicht interferiert. R^3 stellt bevorzugt Wasserstoff oder einen C_1 - C_4 -Alkylrest dar.

Die Verbindung der Formel (A) kann in den Liposomen als racemisches Gemisch, also mit einer Phospho-rac-(1 oder 3)-oligoglycerinverknüpfung vorliegen. Bevorzugt liegt sie in stereospezifischer Form mit einer Phospho-sn-1-oligoglycerinverknüpfung oder einer Phospho-sn-3-oligoglycerinverknüpfung vor.

Bevorzugt stellt mindestens einer der Reste R^1 und R^2 der Formel (A) eine Acylgruppe dar.

25

Liposomen, in denen die Verbindung der Formel (A) mit $n = 0$ vorliegt, weisen bevorzugt eine negative Überschussladung auf. Es können aber auch Liposomen aus Verbindungen der Formel (A) hergestellt werden, in denen $n = 1$ ist. In diesem Fall weisen die Liposomen bevorzugt keine oder eine positive Überschussladung auf.

Die Liposomen enthalten neben einer Verbindung der Formel (A) Phospholipide oder/und Alkylphospholipide sowie gegebenenfalls Cholesterin. Bevorzugt werden 5 bis 15 Mol-% der Verbindung der Formel (A) eingesetzt. Falls die Liposome keine Überschussladung aufweisen, ist eine Zusammensetzung aus 0 bis 70 Mol-% Cholesterin, 1 bis 50 Mol-% einer Verbindung der Formel (A)

und Phospholipide oder/und Alkylphospholipide bevorzugt. Im Falle einer negativen Überschußladung besteht eine bevorzugte Zusammensetzung der Liposomen aus 0 bis 70 Mol-% Cholesterin, 1 bis 15 Mol-% einer Verbindung der Formel (A) sowie Phospholipiden oder/und Alkylphospholipiden. Ein höherer Anteil an Verbindungen der Formel (A) mit negativer Überschußladung würde zur Instabilität der Liposomen im Blutkreislauf führen. Bevorzugt umfassen die Liposomen 35 bis 43 Mol-%, besonders bevorzugt 38 bis 42 Mol-% Cholesterin, 5 bis 15 Mol-% einer Verbindung der Formel (A) und Phospholipide oder/und Alkylphospholipide.

Die Phospholipide oder/und Alkylphospholipide können beispielsweise Diacylphosphoglycerine definierter Struktur sein. Allgemein können diese Bestandteile der Lipide als Verbindungen definierter Struktur eingesetzt werden.

Im Falle $x > 1$ stammt der Rest $-\text{CH}_2(-\text{CHOH})_x-\text{CH}_2-\text{OH}$ bevorzugt von Zuckeralkoholen, die für $x = 2,4$ Hydroxylgruppen, für $x = 3,5$ Hydroxylgruppen und für $x = 4,6$ Hydroxylgruppen aufweisen. Beispiele solcher Reste sind Mannitderivate für $x = 4$, Lyxitderivat für $x = 3$ und Threitolderivate für $x = 2$.

Die erfindungsgemäßen Liposomen weisen eine deutlich erhöhte Halbwertszeit im Blutkreislauf auf. Bevorzugt beträgt ihre Halbwertszeit mindestens 10 Stunden, besonders bevorzugt mehr als 12 Stunden. Es wurden Halbwertszeiten der erfindungsgemäßen Liposomen von 18 bis 20 Stunden erhalten. Überraschenderweise wurden dabei absolut lineare Abfallkurven der Lipidkonzentrationen im Blut festgestellt. Erfindungsgemäß bevorzugt befinden sich nach 6 Stunden mehr als 50 % und besonders bevorzugt mehr als 60 % der zugegebenen Liposomenmenge im Blut.

Als besonders überraschende Eigenschaft der erfindungsgemäßen Liposomen hat sich ihre bevorzugte Anreicherung in der Milz herausgestellt. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung und der Größe der Liposomen wurden bereits Anreicherungsfaktoren

in der Milz im Vergleich zur Leber um etwa das 25-fache erreicht. Dabei steigt die Anreicherung in der Milz verglichen mit der Leber mit zunehmendem Wert für m in Formel A und mit zunehmender Größe der Liposomen. So steigt der Anreicherungsgrad in der Milz beim Übergang von SUVs (Small Unilamellar Liposomes; Durchmesser etwa 60 nm) auf LUVs (Large Unilamellar Liposomes; Durchmesser etwa 190 nm) um ein Vielfaches. Die bevorzugte Anreicherung in der Milz nimmt auch mit zunehmender Zahl der Kohlenstoffatome in R^1 und R^2 zu.

10

Darüber hinaus wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen Liposomen auch in bestimmten Tumorgeweben angereichert werden. So wurde gefunden, daß eine solche Anreicherung bei dem mit Methylnitrosoharnstoff induzierten Mammakarzinom (MNU-Karzinom) stattfindet.

15

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Liposomen zusätzlich einen oder mehrere pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.

20 Als Wirkstoffe können in der Regel alle Wirkstoffe verwendet werden, die sich mittels Liposomen überhaupt ins Plasma einbringen lassen. Bevorzugte Wirkstoffgruppen sind einerseits Cytostatika, insbesondere Anthracyclin-Antibiotika, wie etwa Doxorubicin, Epirubicin oder Daunomycin, wobei Doxorubicin
25 besonders bevorzugt ist. Weitere bevorzugte Cytostatika sind Idarubicin, Hexadecylphosphocholin, 1-Octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholin, 5-Fluoruracil, cis-Platinkomplexe wie Carboplatin und Novantron sowie Mitomycine.

30 Weitere bevorzugte Wirkstoffgruppen sind immunmodulierende Substanzen wie etwa Cytokine, wobei unter diesen wiederum die Interferone und insbesondere das α -Interferon besonders bevorzugt sind, antimykotisch wirksame Substanzen (z.B. Amphotericin B) und Wirkstoffe gegen Protozoenerkrankungen (Malaria,
35 Trypanosomen- und Leishmanien-Infektionen). Ebenfalls bevorzugt ist Taxol als Wirkstoff.

Eine weitere bevorzugte Wirkstoffgruppe sind lytische Wirkstoffe, wie sie in der DE 41 32 345 A1 beschrieben sind. Der Inhalt dieser Patentanmeldung wird hiermit durch Bezugnahme aufgenommen. Bevorzugt sind Miltefosin, Edelfosin, Ilmofosin sowie SRI62-834.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung von erfindungsgemäßen Liposomen zur Herstellung eines Antitumormittels, wobei der Wirkstoff besonders bevorzugt Doxorubicin ist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Liposomen zur Herstellung eines Mittels zur Beeinflussung der Zellproliferation, wobei der Wirkstoff ein Cytokin, besonders bevorzugt α -Interferon ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die die oben beschriebenen Liposomen und in den Liposomen eingeschlossen einen oder mehrere pharmazeutische Wirkstoffe gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Verdünnungs-, Hilfs-, Träger- und Füllstoffen enthält.

Die erfindungsgemäßen Liposomen werden nach an sich bekannten Methoden hergestellt mit hierfür gängigen Vorrichtungen. Typischerweise kann eine die verschiedenen Komponenten des Liposoms einschließlich 1 bis 50 Mol-% einer Verbindung der Formel (A) enthaltende Lösung in eine Lipidsuspension überführt werden, die dann unter hohem Druck durch Düsen oder durch Lochscheiben gepreßt wird, wobei durch die Größe der Öffnungen in der Lochscheibe die Größe der erhaltenen Liposomen geregelt werden kann. Geeigente Maßnahmen zur Überführung einer Lipidsuspension in Liposomen sind dem Fachmann bekannt. Bevorzugt werden 5 bis 15 Mol-% einer Verbindung der allgemeinen Formel (A) mit 35 bis 43 Mol-% Cholesterin und 42 bis 60 Mol-% Phospholipiden oder/und Alkylphospholipiden in eine Lipidsuspen-

sion überführt, die dann durch geeignete Maßnahmen auf an sich bekannte Weise in Liposomen überführt wird.

Solch bekannte Verfahren können auch zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, die die erfindungsgemäßen Liposomen und einen oder mehrere pharmazeutische Wirkstoffe enthält, verwendet werden. Zum Einschluß wasserunlöslicher Wirkstoffe wird der Wirkstoff dabei zusammen mit den Lipidbestandteilen gelöst, während zum Einschluß wasserlöslicher Wirkstoffe der Lipidfilm mit einer wäßrigen Lösung versetzt wird, die den wasserlöslichen Wirkstoff enthält.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (A) können für $n = 1$ durch Verknüpfen eines definierten Oligoglycerins über die Aminogruppe mit einem Phosphatidylethanolamin hergestellt werden. Dabei erhält man neutrale Verbindungen, also Verbindungen ohne Überschußladung. Bei den zur Verknüpfung eingesetzten definierten Oligoglycerinen handelt es sich um Verbindungen der Formel (B).

20

Zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (A), in der $n = 0$ ist, wird ein definiertes Oligoglycerin mit einem Phosphatidylglycerin verknüpft. Weiterhin können Verbindungen der allgemeinen Formel (A) mit $n = 0$ dadurch hergestellt werden, daß ein definiertes Oligoglycerin oder ein C_4 - C_6 -Zuckeralkohol unter Verwendung eines Phosphorylierungsmittels mit einem Alkohol der Formel $CH_2-OR^1-CHOR^2-CHOH$ verknüpft wird. Bevorzugt wird als Phosphorylierungsmittel $POCl_3$ verwendet.

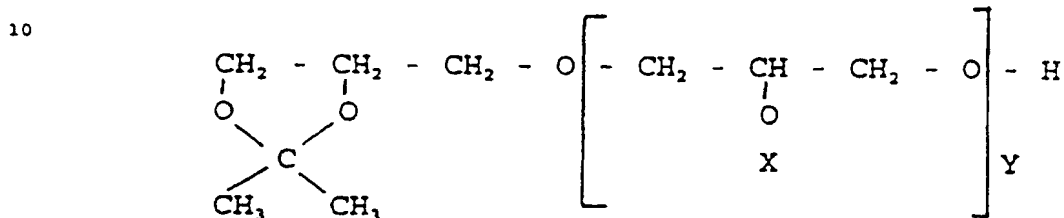
Die Herstellung von Phospholipiden aus Diacylglycerinen ist in der Literatur beschrieben (DE 32 39 817 A1; P. Woolley et al., Chem. Phys. Lipids 47 (1988), 55-62; H. Eibl et al., Chem. Phys. Lipids 47 (1988), 63-68) und kann entsprechend angewendet werden.

35

Durch die oben beschriebenen Verfahren kann eine racemische Verbindung gebildet werden, die eine Phospho-rac-(1 oder 3)-oligoglycerinverknüpfung enthält. Bevorzugt werden durch die

Verfahren stereospezifische Verbindungen gebildet, die eine Phopsho-sn-1-oligoglycerinverknüpfung oder eine Phopsho-sn-3-oligoglycerinverknüpfung aufweist. Bevorzugt wird zur Herstellung einer Verbindung der Formel (A) ein lineares Oligoglycerin definierter Kettenlänge eingesetzt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein geschütztes Oligoglycerin der Formel (B),

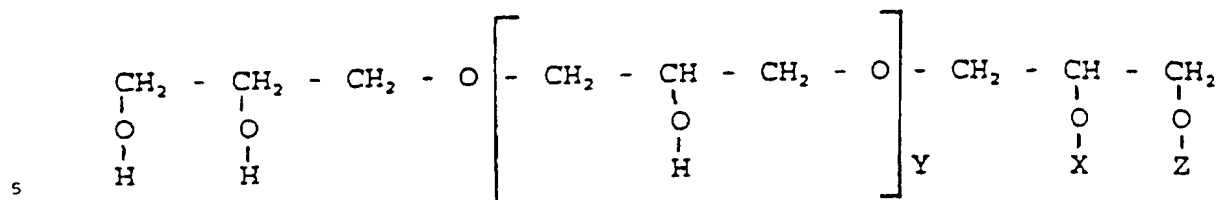


worin Y eine ganze Zahl von 1 bis 9 und X eine Benzyl-, Alkyl- oder Tetrahydropropanylgruppe darstellt. Bevorzugt ist Y eine ganze Zahl von 1 bis 3. Erfindungsgemäß gelingt es, 1.3-verknüpfte Oligoglycerine in praktisch reiner Form zu erhalten.

Es können Oligoglycerine einer bestimmten Kettenlänge hergestellt werden, die praktisch keine Verunreinigungen durch Oligoglycerine anderer Kettenlänge enthalten. Zudem weisen die erfindungsgemäß verwendeten Oligoglycerine praktisch keine Verunreinigung durch monomeres Glycerin auf. Es handelt sich also um einheitliche Verbindungen definierter Struktur.

In dem Oligoglycerin kann X auch eine andere geeignete Schutzgruppe darstellen. Weiterhin kann anstelle von Aceton auch eine andere Schutzgruppe, insbesondere ein anderes Keton vorhanden sein.

Weiterhin umfaßt die Erfindung Alkyloligoglycerine der Formel (C)



worin Y eine ganze Zahl von 0 bis 8, bevorzugt eine ganze Zahl von 1 bis 3 darstellt und einer der Reste X oder Z einen gesättigten oder ungesättigten Alkylrest und der andere der
 10 Reste Wasserstoff darstellt. Auch bei den Alkyloligoglycerinen handelt es sich um einheitliche Verbindungen definierter Struktur.

Die Herstellung von Oligoglycerinen, geschützten Oligoglyceri-
 15 nen und Alkyloligoglycerinen ist von besonderem Interesse, weil mit Hilfe dieser Ausgangsstoffe eine Reihe von wichtigen und neuen Hilfsstoffen zur Lösungsvermittlung und zur Verbesserung der Membranpermeation erhalten werden können. Von besonderem Interesse zur Verlängerung der Liposomenlebenszeit im
 20 Blut ist die Herstellung von Phosphatidyloligoglycerinderivaten der Formel (A), die zusätzliche Hydroxylgruppen im polaren Bereich tragen.

Aufgrund der bevorzugten Anreicherung der erfindungsgemäßen
 25 Liposomen in der Milz eignen sich diese Liposomen generell für die selektive Einführung von Substanzen in die Milz. Hierbei kann es sich um Arzneimittel, Kontrastmittel oder dgl. handeln. Insbesondere ist dies aber für die Verbesserung der Qualität von Impfstoffen von Bedeutung, da die Milz für die
 30 Bildung von Antikörpern im Rahmen des Immunsystems besonders wichtig ist. Ebenso ist die festgestellte Anreicherung der erfindungsgemäßen Liposomen in Tumorgewebe von Bedeutung für die spezifische Zufuhr von Wirkstoffen, Kontrastmitteln und dgl. in ein solches Tumorgewebe.

35

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit den beigefügten Zeichnungen näher erläutert. In den Zeichnungen stellen dar:

Figur 1 eine graphische Darstellung, welche die Verteilung der erfindungsgemäßen Liposomen in Milz und Leber pro Gesamtorgan darstellt.

- 5 Figur 2 eine graphische Darstellung, welche die Verteilung der erfindungsgemäßen Liposomen in Milz und Leber pro Gramm Organ darstellt.

Figur 3 eine graphische Darstellung, welche den Blutspiegel-
10 kurvenverlauf in Abhängigkeit von der Zeit für verschiedene erfindungsgemäße Liposomen darstellt.

Beispiel 1

- 15 In einem Tierversuch wurden Liposomen verwendet, die aus 40 Mol-% Cholesterin, 10 Mol-% Phosphatidylglycerin und 50 % Dipalmitoyllecithin bestanden. Dabei ergab sich eine Halbwertszeit im Serum von 4 Stunden mit einer typischen Abfallkurve, d.h. anfangs sehr rasche Abnahme, später langsamere
20 Abnahme.

Es wurden Liposomen der gleichen Zusammensetzung hergestellt, in denen das Phosphatidylglycerin durch ein erfindungsgemäßes Phosphatidylglycerin G2 ersetzt. Es wurde eine Halbwertszeit
25 im Serum von 18 bis 20 Stunden mit absolut linearer Abfallkurve erhalten. Die lineare Abfallkurve wurde unabhängig von der Größe der hergestellten Liposomen gefunden. Es wurde mit 50 nm Liposomen und mit 150 nm Liposomen der gleiche lineare Abfall der Liposomenkonzentration im Serum gefunden. Weiterhin
30 wurde die lineare Abnahme der Liposomenkonzentration im Blut bei verschiedenen Anfangskonzentrationen festgestellt.

Beispiel 2**Prozentualer Anteil der Liposomen in der Blutzirkulation nach 6 Stunden**

Es wurden erfindungsgemäße Liposomen aus Dipalmitoyl-sn-G-3-PC/Cholesterin/Dipalmitoyl-sn-G-3-PG₂ im molaren Verhältnis von 45 : 45 : 10 hergestellt. Der prozentuale Anteil der ursprünglich zugegebenen Liposomenmenge, die nach 6 Stunden im Blut gefunden wurden, sind in Tabelle 1 angegeben. Zum Vergleich sind die von Maruyama et al. unter den gleichen Bedingungen für das System Distearyl-sn-G-3-PC/Cholesterin/Dipalmitoyl-sn-G-3-PG₂ 45 : 45 : 10 erhaltenen Werte angegeben. Es zeigt sich eine deutliche Erhöhung der gefundenen Liposomenmenge im Vergleich zum Stand der Technik.

15

Tabelle 1:

Vergleichsbeispiel		Beispiel der Erfindung	
Y		Y	
0	18 %	0	21 %
20 2	19 %	2	80 %
3	-	3	82 %
4	20 %	4	56 %

25 Beispiel 3

Liposomen aus 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholin, 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglyceroglycerin (PG_n) und Cholesterin im molaren Verhältnis 4:1:5 wurden mit tritiummarkiertem Inulin dotiert. Diese Liposomen wurden in einer Dosierung von 100 µmol Lipid pro kg Ratte an Ratten verabreicht und nach 72 Stunden die Verteilung dieser Liposomen über die Organe Milz und Leber durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Die Organgewichte der Leber variierten zwischen 9 und 10 g, die der Milz zwischen 0,6 und 0,7 g. Figur 1 der beigefügten Zeichnung zeigt, daß bei einem etwa 15-fach höheren Lebergewicht bei Verwendung von SUVs die Verteilung mit zusätzlicher Zahl der Glycerineinheiten (x = 1; m = 1 bis 4 in Formel A) zugunsten der Milz erheblich zunimmt.

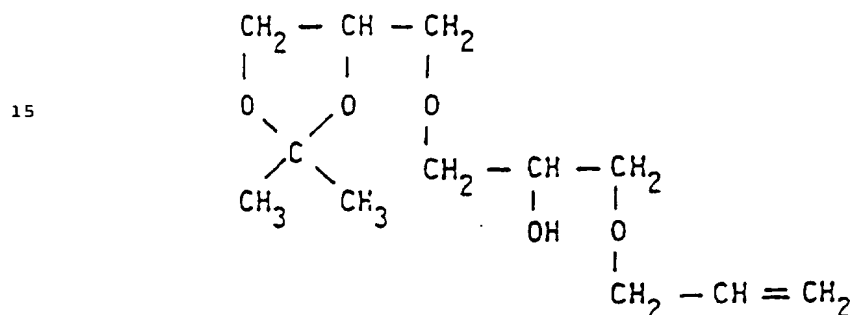
In Figur 2 ist die Aufnahme der Liposomen in die Organe Milz und Leber pro Gramm Organ wiedergegeben. Danach enthält die Milz bei $n = 4$ eine etwa 9 mal so hohe Konzentration an Liposomen wie die Leber, für $m = 1$ ist der Anreicherungsfaktor gleich 4. Die Figuren 1 und 2 zeigen zudem in der letzten Spalte den Effekt der Liposomengröße. Für LUVs mit einem Durchmesser von 190 nm ergibt sich daraus eine weitere Verstärkung der Anreicherung in der Milz, so daß bereits bei $n = 2$ der Anreicherungsfaktor gleich 24 ist. Praktisch wird mit diesen Liposomen das Organ Leber nicht mehr erreicht.

Beispiel 4

Herstellung von Verbindungen der Formel (A)

5 Beispiel 4a: Zentrales Zwischenprodukt der Formel I

Die Oligoglycerine Diglycerin (G_2), Triglycerin (G_3) und Tetra-
glycerin (G_4) können aus einem leicht erreichbaren, zentralen
Zwischenprodukt der Formel I, 1.2-Isopropyliden-rac-glyce-
10 ro-3.1-rac-glycero-3-allylether, hergestellt werden (siehe
Schema A).



20 I

25

1) Umlagerung Allyl/Propenyl

2) saure Spaltung

G_2

1)1) Epoxidation

2)2) saure Spaltung

G_3

30

1) Epoxidation

2) Öffnung mit Allylalkohol

3) Epoxidation

4) saure Spaltung

G_4

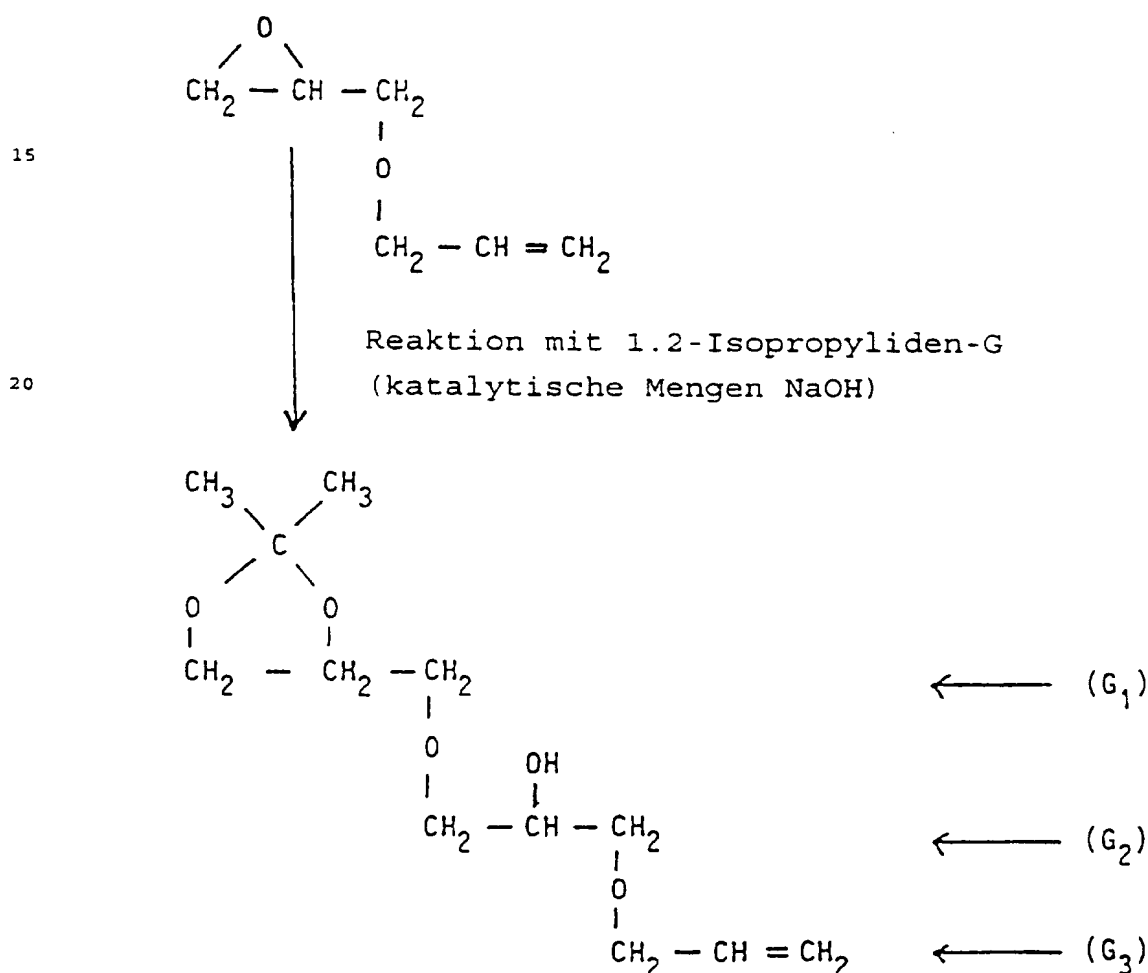
35 Schema A: Oligoglycerine aus Formel I

Das in Formel I beschriebene Zwischenprodukt kann in großen Mengen aus käuflichem Allylglycidylether durch NaOH katalysierte Ringöffnung mit ebenfalls im Chemikalienhandel erhältlichem 1.2-Isopropyliden-rac-glycerin erhalten werden:

Epoxidöffnung mit Alkoholen (allgemeines Beispiel)

Herstellung des zentralen Zwischenproduktes der Formel I:

10 1.2-Isopropyliden-rac-G₁-3.1-0.0-3-0-allyl-rac-G₂



1.2-Isopropyliden-rac-glycerin (MG 132.16; 16 Mol - 2115 g) wird mit katalytischen Mengen NaOH (MG 40.00; 0.6 Mol - 24 g) versetzt und unter Rühren und Erwärmen auf 80°C in Lösung
5 gebracht. Bei 80°C wird Allyl-glycidyl-ether (MG 114.14; 6 Mol - 685 g) tropfenweise in einem Zeitraum von 2 Stunden zugegeben und der Ansatz noch weitere 2 Stunden bei 80°C gerührt. Zu diesem Zeitpunkt hat sich das Epoxid vollständig (Rf 0.8 in Ether) unter Bildung des G₃-Bausteines (Rf 0.60 in Ether)
10 umgesetzt. Das überschüssige Isopropyliden-rac-glycerin hat einen Rf-Wert von 0.65 in Ether und wird bei 75°C / 10 mbar aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Der Rückstand wird mit 1 l Diisopropylether versetzt und zweimal mit jeweils 1 l NaCl (1 %-ige Lösung in H₂O) extrahiert. Die organische Phase wird
15 einrotiert und destilliert (Kp₁₀-1 mbar 125°C).

Die Ausbeute an reinem Produkt, 1.2-Isopropyliden-rac-G₁-3.1-0.0-3-0-allyl-rac-G₂. (MG 246.30), ist 1025 g (ca. 70 %).

20 Anstelle von 1.2-Isopropyliden-rac-glycerin können andere primäre Alkohole sowie Allylalkohol und Benzylalkohol nach den angegebenen Bedingungen umgesetzt werden. Entsprechend können auch andere Epoxide auf die gleiche Weise eingesetzt werden.

25 Das Zwischenprodukt der Formel I kann auch aus 1.2-Isopropyliden-rac-glycero-3-glycidylether durch NaOH katalysierte Ringöffnung mit Allylalkohol erhalten werden. In diesem Falle muß zunächst 1.2-Isopropyliden-rac-glycero-3-glycidylether aus Allylglycerin hergestellt werden.

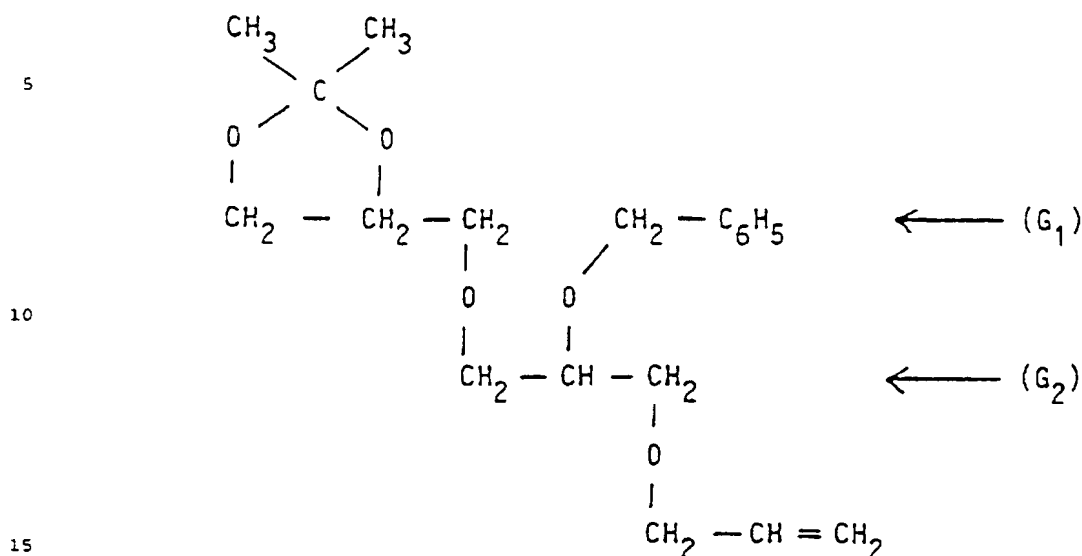
30

Beispiel 4b:

Alkylierung von primären oder sekundären Hydroxylgruppen
(allgemeines Beispiel)

35

Herstellung eines zentralen Zwischenproduktes:
1.2-Isopropyliden-rac-G₁-3.1-0.0-2-0-benzyl-3-0-allyl-rac-G₂



Das zentrale Zwischenprodukt, 1.2-Iso-propyliden-rac-G₁-3.1-rac-G₂-O-allylether (MG 246.30; 0.5 Mol
 20 - 123 g) wird in 500 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit Benzylchlorid (0.6 Mol - 76 g) versetzt und unter Rückfluß gekocht. Man läßt K-tert. Butylat (0.7 Mol - 79 g) gelöst in 500 ml Tetrahydrofuran langsam eintropfen. Die Reaktion ist nach 30 Minuten Kochen unter Rückfluß abgeschlossen (DC-Kontrolle -
 25 R_f-Werte in Ethylether: Edukt, R_f = 0.1; Produkt, R_f = 0.4). Das Reaktionsgemisch wird mit 1 l Diisopropylether und mit 1 l 1%-iger NaCl-Lösung versetzt, geschüttelt, und die obere Phase einrotiert. Das Produkt kann direkt weiterverwendet werden oder durch Chromatographie an Kieselgel in reiner Form in ca.
 30 90%-iger Ausbeute gewonnen werden.

Summenformel C₁₉H₂₈O₅ (MG 336.42)

ber.: C, 67.83; H, 8.39; O, 23.79

35 gef.: C, 67.78; H, 8.34; O, -

Anstelle von Benzylchlorid können auch Benzylbromid, Allylchlorid oder Allylbromid sowie die Halogenide oder Mesylate

von primären Alkoholen verwendet werden. Insbesondere führen die Produkte aus der Reaktion primärer oder sekundärer Hydroxylgruppen mit Alkylmesylaten in hohen Ausbeuten (> 90%) zu den gewünschten Zielverbindungen.

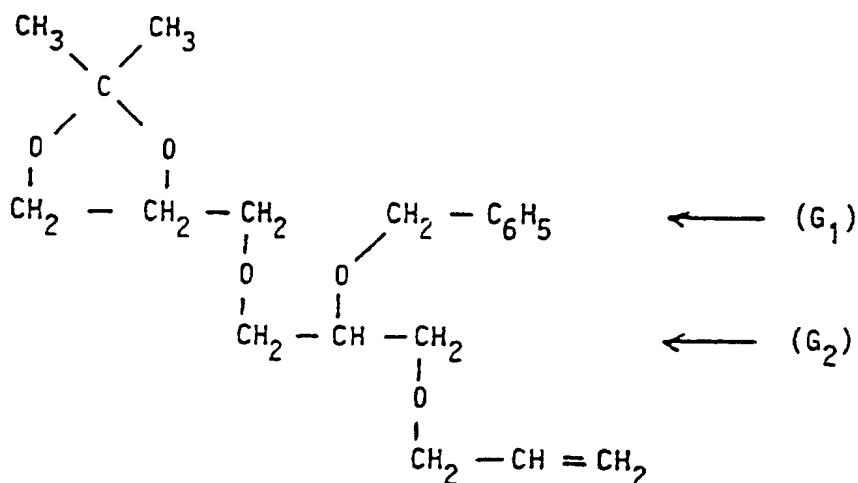
5

- 20 -

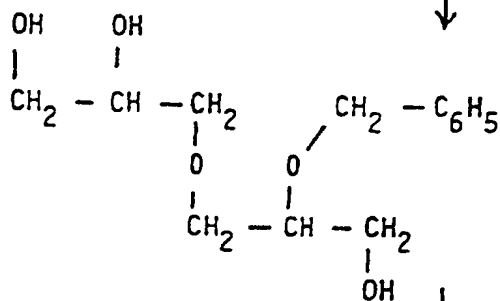
Beispiel 4c:

Synthesesequenz O-Allylether → O-Propenylether → Alkohol (allgemeines Beispiel)

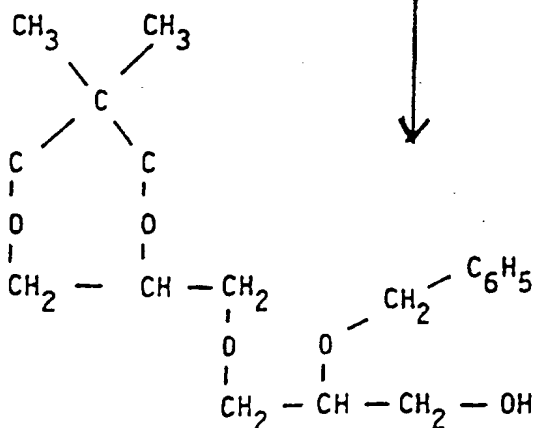
5

Herstellung von 2-O-Benzyl-rac-G₁-1.3-O.0-1.2-isopropyliden-rac-G₂

- 1) K-tert. Butylat in Dimethylformamid
2) HCl / H₂O in 1-Propanol



- 3) 2.2-Dimethoxypropan
(H₂SO₄)



ERSATZBLATT (REGEL 26)

Umlagerung

1.2-Isopropyliden-rac-G₁-3.1-0.0-2-0-benzyl-3-0-allyl-rac-G₂
(0.5 Mol - 168 g) wird in 500 ml DMF gelöst und mit K-tert.
s Butylat (0.7 Mol - 79 g) versetzt. Man erhitzt unter Rühren
auf 110 bis 115°C (Temperatur im Reaktionsgemisch), beläßt die
Reaktion für 15 Minuten bei dieser Temperatur und kühlt das
Reaktionsgemisch auf 20°C. Nach Zugabe von 500 ml Diisopropyl-
ether und 500 ml 1% NaCl wird die obere Diisopropyletherphase
10 abgenommen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt (DC-Kon-
trolle - Rf-Werte in Hexan/Diisopropylether (1:1): Edukt, Rf =
0.2; Produkt, Rf = 0.4).

Abspaltung der Propenyl-Schutzgruppe

15 Der Rückstand aus obiger Reaktion, ca. 168 g, wird in 500 ml
Methanol gelöst und unter Rückfluß nach Zugabe von 50 ml 1 M
HCl gekocht. Nach 60 Minuten ist die Reaktion beendet (DC-Kon-
trolle in Hexan/Diisopropylether (1:1): Edukt, Rf = 0.4; Pro-
20 dukt, Rf = 0). Die Ausbeute an rac-G₁-3.1-rac-G₂-2-0-benzyl-
ether beträgt > 90%. Unter den sauren Bedingungen der Pro-
penylabspaltung wird auch die Isopropylidenschutzgruppe ent-
fernt. Bei Bedarf kann die Isopropylidenschutzgruppe wieder in
die 1.2-Position eingeführt werden.

Einführung der Isopropyliden-Schutzgruppe

25 Der Rückstand der obigen Reaktion (ca. 0.5 Mol) wird in 300 ml
THF gelöst, nacheinander mit 2.2-Dimethoxypropan (0.5 Mol - 52
30 g) und 0.2 g H₂SO₄ in 10 ml THF versetzt und 2 Stunden bei 25°C
gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit gesättigter Na₂CO₃-Lö-
sung neutralisiert, der Niederschlag abgesaugt und das Filtrat
im Vakuum mit Xylol einrotiert und dadurch von Wasser befreit.
Das Produkt wird durch Chromatographie an Kieselgel 60 (Merck,
35 Korngröße 0.2 - 0.5 mm) gereinigt (Rf-Werte in Diethylether:
Edukt, Rf = 0.0; Produkt, Rf = 0.4). Man erhält 121 g des für
die Herstellung von Phosphatidyl-diglycerinen (G₂-Grundkörper)
wichtigen Zwischenproduktes.

G₂-Grundgerüst: 2-0-Benzyl-rac-G₁-1.3-0.0-1.2-isopropyliden-rac-G₂ (Ausbeute 82%).

Summenformel: C₁₆H₂₄O₅ (MG 296.36)

5 ber.: C, 64.85; H, 8.16; O, 26.99
gef.: C, 64.82; H, 8.14; O, -

Entsprechend können die für die Herstellung der Phosphatidyl-
oligoglycerine wichtigen Zwischenprodukte mit höheren Oligo-
10 glycerinanteilen hergestellt werden. Einige Analysedaten für
zentrale Zwischenprodukte sind nachfolgend zusammengestellt
worden:

G₃-Grundgerüst: 2-0-Benzyl-rac-G₁-1.3-0.0-2-0-benzyl-rac-
15 G₂-1.3-0.0-1.2-isopropyliden-rac-G₃

Summenformel: C₂₄H₃₆O₇ (MG 460.56)

ber.: C, 67,81; H, 7.88; O, 24.32
gef.: C, 67,75; H, 7.85; O, -

20 G₄-Grundgerüst:

2-0-Benzyl-rac-G₁-[1.3-0.0-2-0-benzyl-G]₂-1.3-0.0-1.2-iso-
propyliden-rac-G₄

Summenformel: C₃₆H₄₈O₉ (MG 624.77)

ber.: C, 69.21; H, 7.74; O, 23.05
25 gef.: C, 69.17; H, 7.69; O, -

G₆-Grundgerüst:

2-0-Benzyl-rac-G₁[1.3-0.0-2-0-benzyl-rac-G]₄-1.3-0.0-1.2-iso-
propyliden-rac-G₆

30 Summenformel: C₅₆H₇₂O₁₃ (MG 953.172)

ber.: C, 70.57; H, 7.61; O, 21.82
gef.: C, 70.56; H, 7.54; O, -

G₈-Grundgerüst:

35 2-0-Benzyl-rac-G₁-[1.3-0.0-2-0-benzyl-rac-G]₆-1.3-0.0-1.2-
isopropyliden-rac-G₈

Summenformel: $C_{76}H_{96}O_{17}$ (MG 1281.58)

ber.: C, 71.23; H, 7.55; O, 21.22

gef.: C, 71,15; H, 7.53; O, -

5 Beispiel 4d:

Substanzen, die die Tetrahydropyranyl-Schutzgruppe tragen
(anstelle von Benzyl)

(Herstellung von Phosphatidyl-oligoglycerinen, die unge-
10 sättigte Fettsäuren enthalten)

Für die Durchführung dieser Variante wird 1.2-Isopropyliden-rac-glycero-3-0-allylether nach H. Eibl und P. Woolley, Chem. Phys. Lipids 41 (1986) 53-63, hergestellt und
15 epoxidiert.

Epoxidation (allgemeines Beispiel)

1.2-Isopropyliden-rac-glycero-3-0-allylether (MG 172.22; 1 Mol
20 - 172 g) wird in 1 l CH_2Cl_2 gelöst. 3-Chlorperoxybenzoesäure
(1.1 Mol) wird portionsweise zugegeben und für 6 Stunden bei
25 - 30°C gerührt. Das Edukt (R_f 0.5 in Diethylether/Pentan
1:1) hat sich vollständig in das gewünschte Produkt (R_f 0.2 in
obigem System) umgesetzt. Man saugt vom Niederschlag ab, gibt
25 zum Filtrat 100 g Na_2CO_3 und rührt für weitere 3 Stunden bei
20°C. Man saugt den Niederschlag ab und entfernt das Lösungs-
mittel im Vakuum. Die Ausbeute an Epoxid (MG 188.22) beträgt
170 g (90%). Das Epoxid wird nun, wie unter Epoxidöffnung mit
Alkoholen (Beisp. 4a) beschrieben, mit Benzylalkohol in
30 1-0-Benzyl-rac- G_1 -3.1-0.0-2.3-isopropyliden-rac- G_2 umgewandelt
und die freie OH-Gruppe mit 3.4-Dihydro-2H-Pyran in das Tetra-
hydropyranderivat umgewandelt.

Einführung der Tetrahydropyran-Schutzgruppe (allgemeines Bei-
35 spiel)

1-0-Benzyl-rac- G_1 -3.1-0.0-2.3-isopropyliden-rac- G_2 (MG 296.36;
1 Mol - 296 g) wird in 1 l THF gelöst, mit 1.4 Mol 3.4-Di-

hydro-2H-Pyran versetzt und 0.1 Mol Toluolsulfonsäure zugegeben. Nach 1 Stunde ist die Umsetzung abgeschlossen (Edukt, Rf 0.65; Produkt, Rf 0.90 in Diethylether). Man versetzt mit 1 l 0.2 Mol Na_2CO_3 Lösung und mit 1 l Diisopropylether und schüttelt in einem Scheidetrichter gut durch. Die obere Phase wird einrotiert und das Produkt durch Hydrogenolyse mit H_2 in Gegenwart eines Pd/C-Katalysators (5% Pd auf Alkohole) in den G_2 -Baustein mit freier Hydroxylgruppe umgewandelt.

- 10 G2-Grundgerüst: 2-0-Tetrahydropyranyl-rac- G_1 -1.3-0.0-1.2-isopropyliden-rac- G_2 (Ausbeute 80% bezogen auf das Epoxid)

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{O}_6$ (MG 291.36)

ber.: C, 57.71; H, 9.34; O, 32.95

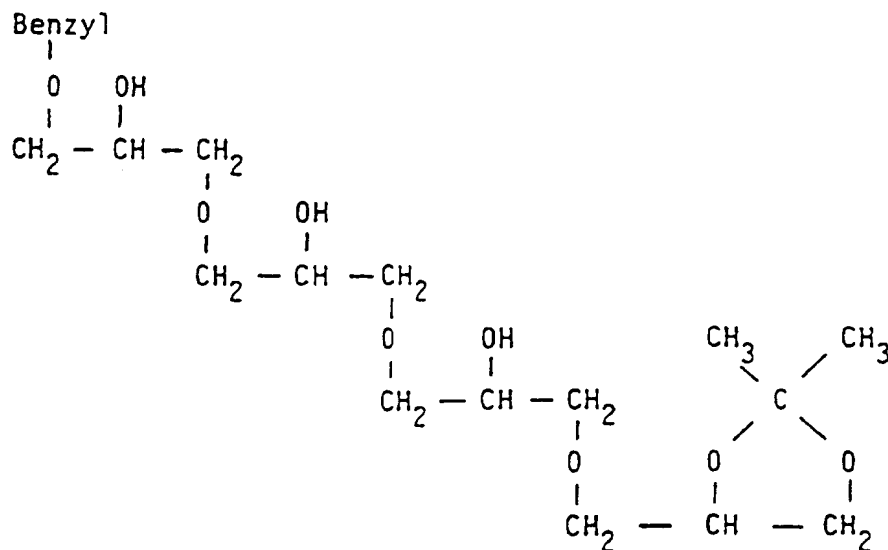
15 gef.: C, 57.59; H, 9.29; O, -

Entsprechend können die Verbindungen mit anderen Grundgerüsten in THP-geschützte Strukturen umgewandelt werden. Z.B. kann der 3-0-Allylether von Beispiel 4a in ein Epoxid umgewandelt und mit Allylalkohol geöffnet werden. Es entsteht wieder ein 3-0-Allylether, der epoxidiert und mit Benzylalkohol geöffnet wird zu unten stehendem Produkt, das durch Einführung von 3 THP-Schutzgruppen und katalytische Hydrogenolyse in ein Zwischenprodukt mit G_4 -Grundgerüst umgewandelt werden kann.

25

30

35



G₄-Grundgerüst:

2-O-THP-rac-G₁[1.3-0.0-2-0-THP-rac-G]₂-1.3-0.0-1.2-isopropyl-
iden-rac-G₄

Summenformel: C₃₀H₄₅O₂ (MG 607.75)

ber.: C, 59.29; H, 9.12; O, 31.59

gef.: C, 59.24; H, 9.08; O, -

Beispiel 4e:

Weiterverarbeitung des Zwischenprodukts der Formel I

G₂-Grundkörper (racemisch)

Aus Formel I kann ein zentrales Zwischenprodukt für die Herstellung der G₂-Grundkörper erhalten werden (siehe Schema B).

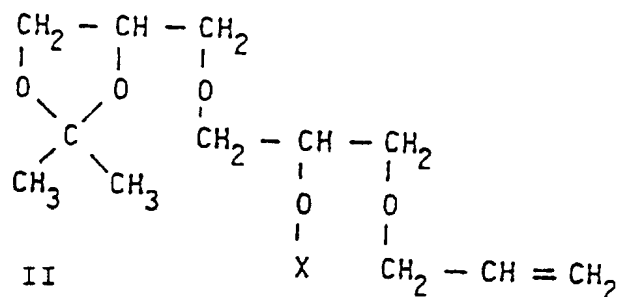
Dazu wird die sekundäre OH-Funktion in Formel I alkyliert, benzyliert oder mit Tetrahydropyranyl geschützt.

Formel I

a) Alkylierung

b) Benzylierung

↓ c) Einführung der THP-Schutzgruppe



Schema B: Zentrales Zwischenprodukt zur Herstellung der G₂-Grundkörper:

X = gesättigtes oder ungesättigtes Alkyl, Benzyl oder THP

Alkyl-G₂-Verbindungen1) 2-O-Alkyl-rac-G₁-1.3-O.0-rac-G₂

5

Die Zwischenverbindung der Formel II mit X = Alkyl wird von den Schutzgruppen befreit. Es wurden folgende Verbindungen dargestellt:

10	<u>2-O-Ethyl-G₂:</u>	C ₈ H ₁₈ O ₅	(194.23)
	<u>2-O-Hexyl-G₂:</u>	C ₁₂ H ₂₆ O ₅	(250.33)
	<u>2-O-Undecenyl-G₂:</u>	C ₁₇ H ₃₄ O ₅	(318.45)
	<u>2-O-Dodecyl-G₂:</u>	C ₁₈ H ₃₈ O ₅	(334.49)
	<u>2-O-Octadecyl-G₂:</u>	C ₂₄ H ₅₀ O ₅	(418.65)
15	<u>2-O-Erucyl-G₂:</u>	C ₂₈ H ₅₆ O ₅	(472.75)

2) 1-O-Alkyl-rac-G₁-3.1-O.0-rac-G₂

In der Zwischenverbindung der Formel II mit X = Benzyl wird
20 Allyl aus der 1-Position entfernt und die entsprechende Alkylkette in 1-Position eingeführt. Nach Entfernung der Schutzgruppen wurden folgende Verbindungen erhalten:

	<u>1-O-Methyl-G₂:</u>	C ₇ H ₁₆ O ₅	(180.20)
25	<u>1-O-Propyl-G₂:</u>	C ₉ H ₂₀ O ₅	(208.25)
	<u>1-O-Nonyl-G₂:</u>	C ₁₅ H ₃₂ O ₅	(292.41)
	<u>1-O-Undecyl-G₂:</u>	C ₁₇ H ₃₆ O ₅	(320.47)
	<u>1-O-Dodecyl-G₂:</u>	C ₁₈ H ₃₈ O ₅	(334.49)
	<u>1-O-Octadecyl-G₂:</u>	C ₂₄ H ₅₀ O ₅	(418.65)

30

Ungesättigte 1-O-Alkyldiglyceride können auch direkt über Epoxidöffnung von 1.2-Isopropyliden-glycero-glycidylether (Schema D, Formel IV) mit Alkoholen erhalten, z.B.

	<u>1-O-Undecenyl-G₂:</u>	C ₁₇ H ₃₄ O ₅	(318.45)
--	-------------------------------------	--	----------

35

Dieser Weg ist jedoch nur für kürzerkettige Alkohole geeignet, da die Ausbeuten für längerkettige Alkohole wie z.B. Oleylalkohol gering sind. Zur Herstellung von 1-Oleyl-G₂ wird deshalb

ein Syntheseweg über 2-O-THP-glycero-1.3-O.0-(1.2-isopropyliden)-glycerin vorgezogen (Schema D, Formel V)

1-O-Oleyl-G₂: $C_{24}H_{48}O_5$ (416.64)

- 5 Zwischenprodukte für die Synthese von Phospholipiden, die Dicylcerine im polaren Bereich enthalten

Verbindungen mit günstigen Schutzgruppen für diese Synthesen enthalten in G₁ eine 2-O-Benzylether- oder eine 2-O-Tetrahydro-
10 pyranylethergruppe:

- 1) 2-O-Benzyl-rac-G₁-1.3-O.0-(1.2-isopropyliden)-rac-G₂:

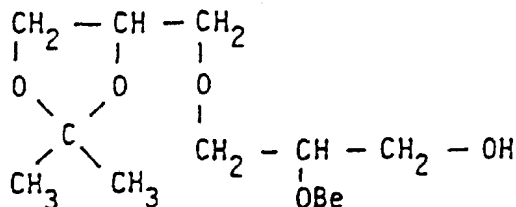
$C_{16}H_{24}O_5$ (296.36)

- 15 Die Verbindung der Formel III wird durch basische Umlagerung von Allyl in Propenyl, Benzylierung der sekundären OH-Gruppe und anschließende saure Abspaltung der Propenylschutzgruppe erhalten.

Formel I



- 1) Umlagerung Allyl/Propenyl
2) Benzylierung
3) saure Spaltung

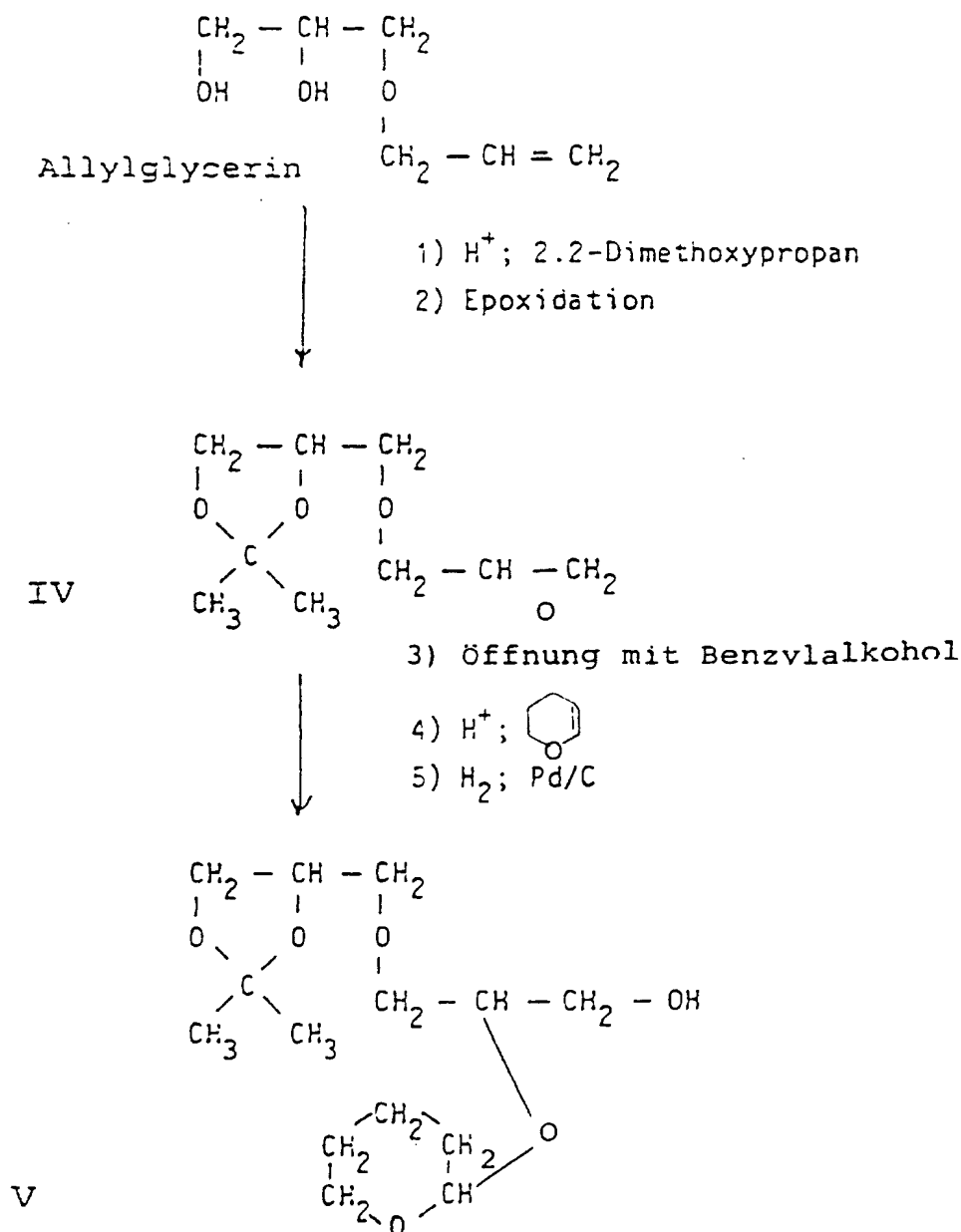


Schema C: Ausgangsprodukt für Phosphatidyl-di-glycerine mit gesättigten Fettsäureresten.

- 2) 2-O-Tetrahydropyranyl-rac-G₁-1.3-O.0-(1.2-isopropyliden)-rac-G₂:

$C_{14}G_{27}O_6$ (291.36)

Die Verbindung der Formel V wird aus Allylglycerin hergestellt. Nach Anlagerung von Isopropyliden wird epoxidiert und man erhält das Zwischenprodukt IV. nach Öffnung des Epoxids mit Benzylalkohol wird die THP-Schutzgruppe eingeführt und die Benzylgruppe entfernt.

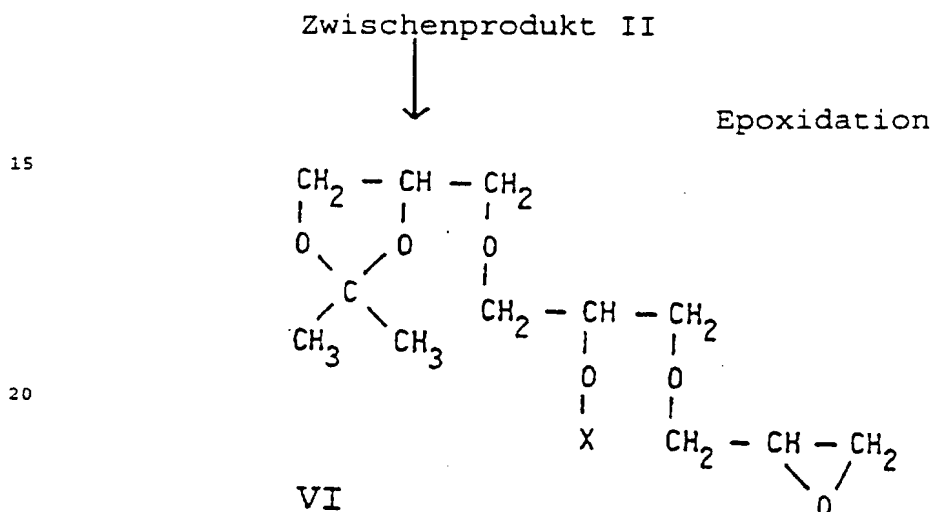


Schema D: Ausgangsprodukt für Phosphatidyl-di-glycerine mit ungesättigten Fettsäureresten

G₃-Grundkörper (racemisch)

5

Aus dem zentralen Zwischenprodukt der Formel II können unter Einbeziehung der Allylgruppe die Triglyceride entwickelt werden. Nach Epoxidation können aus dem Epoxid verschiedene Zwischen- oder Endprodukte von pharmazeutischen Interesse hergestellt werden.



Schema E: Ausgangsprodukte für die Herstellung von G₃-Grundkörpern.

Aus dem zentralen Zwischenprodukt der Formel VI können Triglycerine hergestellt werden; das Zwischenprodukt dient auch zur Herstellung des G₄-Grundkörpers. In der Formel VI stellt X Wasserstoff, einen gesättigten Alkyl-, einen Benzyl- oder einen THP-Rest dar.

Alkyl-G₃-Verbindungen

1) 1-O-Alkyl-rac-G₁-1.3-0.0-rac-G₂-1.3-0.0-rac-G₃

35

Das Epoxid der Formel VI (X = H) wird mit Alkoholen direkt geöffnet und ergibt nach Abspaltung der Isopropyliden-Schutzgruppe folgende Verbindungen:

<u>1-O-Ethyl-G₃</u> :	C ₁₁ H ₂₄ O ₇	(268.30)
<u>1-O-Hexyl-G₃</u> :	C ₁₅ H ₃₂ O ₇	(324.41)
<u>1-O-Nonyl-G₃</u> :	C ₁₈ H ₃₈ O ₇	(366.491)
<u>1-O-Undecenyl-G₃</u> :	C ₂₀ H ₄₀ O ₇	(392.53)
5 <u>1-O-Dodecyl-G₃</u> :	C ₂₁ H ₄₄ O ₇	(408.57)

Für längerkettige Alkohole sind die Ausbeuten bei der direkten Öffnung schlecht. Deshalb wurden die Oleyl- und Erucyl-Verbindungen von G₃ durch Öffnung von VI (X = THP) mit Benzyl, Schutz der gebildeten sekundären Hydroxylgruppen mit THP, katalytische Debenzylierung, Alkylierung in 1-Position und Entfernung der Schutzgruppen hergestellt.

<u>1-O-Oleyl-G₃</u> :	C ₂₇ H ₅₄ O ₇	(490.72)
15 <u>1-O-Erucyl-G₃</u> :	C ₃₁ H ₆₂ O ₇	(456.82)

2) 2-O-Alkyl-rac-G₁-1.3-0.0-rac-G₂-1.3-0.0-rac-G₃

Das Epoxid der Formel VI (X = Benzyl oder THP) wird mit Allyl-alkohol geöffnet und in der 2-Position alkyliert. Die Schutzgruppen werden auf übliche Weise entfernt. Bei der Herstellung der ungesättigten 2-O-Alkylverbindungen muß die Umlagerung der Allyl-Schutzgruppe vor der Alkylierung erfolgen. Außerdem kann in diesem Fall in G₂ nur die THP-Schutzgruppe, nicht aber Benzyl verwendet werden. Folgende Verbindungen wurden hergestellt:

<u>2-O-Methyl-G₃</u> :	C ₁₀ H ₂₂ O ₇	(111.99)
<u>2-O-Propyl-G₃</u> :	C ₁₂ H ₂₆ O ₇	(282.33)
30 <u>2-O-Nonyl-G₃</u> :	C ₁₈ H ₃₈ O ₇	(366.49)
<u>2-O-Undecenyl-G₃</u> :	C ₂₀ H ₄₀ O ₇	(392.53)
<u>2-O-Dodecyl-G₃</u> :	C ₂₁ H ₄₄ O ₇	(408.57)
<u>2-O-Hexadecyl-G₃</u> :	C ₂₅ H ₅₂ O ₇	(464.68)
<u>2-O-Oleyl-G₃</u> :	C ₂₇ H ₅₄ O ₇	(490.72)
35 <u>2-O-Erucyl-G₃</u> :	C ₃₁ H ₆₂ O ₇	(546.82)

Zwischenprodukte für die Synthese von Phospholipiden, die Triglyceride im polaren Bereich enthalten

- 5 Günstige Schutzgruppen für den Aufbau von Phospholipiden, die G_3 -Reste im polaren Bereich enthalten, sind Benzylreste und Tetrahydropyranylreste (THP). Benzylreste können einfach und unter milden Bedingungen entfernt werden, allerdings mit der Einschränkung, daß nur gesättigte Fettsäuren verwendet werden
 10 können. THP-Reste sind von besonderem Interesse, da sie in Verbindung mit Isopropylschutzgruppen in einem Schritt abgelöst werden können.

- 1) 2-O-Benzyl-rac- G_1 -1.3-0.0-(2-O-Benzyl)-rac- G_2 -1.3-0.0-(1.2-isopropyliden)-rac- G_3
 15



Diese Verbindung kann aus dem zentralen Zwischenprodukt VI (X = Benzyl) durch Öffnen mit Allylalkohol, Benzylierung der 2-
 20 Position und Abspaltung der Allylschutzgruppe erhalten werden. Sie wird im Text als Formel VII bezeichnet.

- 2) 2-O-THP-rac- G_1 -1.3-0.0-(2-O-THP)-rac- G_2 -1.3-0.0-(1.2-isopropyliden)-rac- G_3 :
 25



Zur Darstellung ungesättigter G_3 -Phospholipide wird in VI der Rest X = THP verwendet. Man öffnet das Epoxid VI mit Benzylalkohol, schützt die freiwerdende sekundäre Hydroxylgruppe mit
 30 THP und entfernt den Benzylrest katalytisch mit H_2 /Pt. Die so hergestellte Verbindung wird im Text als Formel VIII bezeichnet.

Zusätzliche Bemerkungen

35

In der bisherigen Beschreibung haben wir von der Tatsache nicht Gebrauch gemacht, daß in der Formel VI für X = gesättigtes Alkyl einfach Verbindungen folgender Struktur hergestellt

werden können: 1-O-Alkyl-rac-G₁-3.1-0.0-(2-O-alkyl)-rac-G₂-3.1-rac-G₃. Die Vertreter dieser neuen Strukturen wurden hergestellt durch Öffnen des Epoxids VI (X = Hexadecyl) mit CH₃OH oder Undecenylalkohol und Abspaltung der Isopropyliden Schutzgruppe

1-O-Methyl-rac-G₁-3.1-0.0-(2-O-hexadecyl)-rac-G₂-3.1-rac-G₃:

C₂₆H₅₄O₇

(478.71)

1-O-Undecenyl-rac-G₁-3.1-0.0-(2-O-hexadecyl)-rac-G₂-3.1-0.0-rac-G₃:

C₃₆H₇₂O₇

(616.958)

G₄-Grundkörper (racemisch)

Aus dem zentralen Zwischenprodukt der Formel IX können G₄-Grundkörper hergestellt werden.

Zwischenprodukt VI

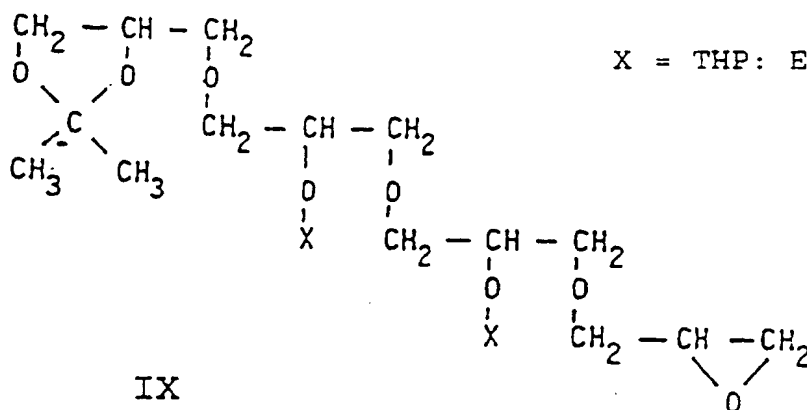
(X = H, gesättigtes Alkyl,
Benzyl oder THP)

1) Öffnung mit Allylalkohol

2) X = H: Epoxidation

X = Be: Benzylierung von
2-OH, dann Epoxidation

X = THP: Einführung von THP
in 2-OH, dann
Epoxidation



Schema F: Ausgangsprodukte für die Herstellung von G₄-Grundkörpern.

Aus dem zentralen Zwischenprodukt der Formel IX können Tetraglycerine hergestellt werden. Sie können auch zur Herstellung von Pentaglycerinen verwendet werden.

Aus den Zwischenverbindungen können auch Oligoglycerine mit zwei oder mehr Alkylresten hergestellt werden. Geeignete Ausgangsverbindungen hierfür sind Moleküle der Formel IX in denen X einen gesättigten Alkylrest darstellt.

Alkyl-G₄-Verbindungen

- 1) 1-O-Alkyl-rac-G₁-1.3-0.0-rac-G₂-1.3-0.0-rac-G₃-1.3-0.0-rac-G₄

Das Epoxid der Formel IX, X = H, wird mit Alkoholen direkt geöffnet. Das ergibt nach Abspaltung der Isopropyliden-Schutzgruppe folgende Substanzen:

1-O-Ethyl-G ₄ :	C ₁₄ H ₃₀ O ₉	(342.38)
1-O-Hexyl-G ₄ :	C ₁₈ H ₃₈ O ₉	(398.49)
1-O-Undecyl-G ₄ :	C ₁₉ H ₄₀ O ₉	(412.52)
1-O-Undecenyl-G ₄ :	C ₁₉ H ₃₈ O ₉	(410.50)
1-O-Dodecyl-G ₄ :	C ₂₀ H ₄₂ O ₉	(426.54)

Dieser Weg ist nur für kürzerkettige Alkohole geeignet, da die Ausbeuten für längerkettige Alkohole stark abfallen.

30

Für längerkettige Alkohole, die gesättigt sind, muß deshalb wie bei G₂ und G₃ ein Syntheseweg über das zentrale Zwischenprodukt mit X = Benzyl gewählt werden. Man öffnet mit Allylalkohol, benzyliert die freiwerdende 2-OH-Gruppe, entfernt die Allylgruppe in der 1-Position und alkyliert die 1-Position. Nach Entfernen der Schutzgruppen erhält man:

1-0-Hexadecyl-G ₄ :	C ₂₄ H ₅₀ O ₉	(482.99)
1-0-Octadecyl-G ₄ :	C ₂₆ H ₅₄ O ₉	(510.70)
1-0-Behenyl-G ₄ :	C ₃₀ H ₆₂ O ₉	(566.81)

2. 2-O-Alkyl-rac-G₁-1.3.-0.0-rac-G₂-1.3-0.0-rac-G₃-1.2-0.0-
rac-G₄

Die zentrale Zwischenverbindung der Formel IX wird mit Allyl-
10 alkohol geöffnet und die freiwerdende 2-Position alkyliert.
Nach Entfernen der Schutzgruppen erhält man:

	2-0-Propyl-G ₄ :	C ₅ H ₃₂ O ₉	(356.41)
	2-0-Hexyl-G ₄ :	C ₁₈ H ₃₈ O ₉	(398.49)
15	2-0-Nonyl-G ₄ :	C ₂₁ H ₄₄ O ₉	(440.57)
	2-0-Undenyl-G ₄ :	C ₁₉ H ₃₈ O ₉	(410.50)
	2-0-Dodecyl-G ₄ :	C ₂₀ H ₄₂ O ₉	(426.54)
	2-0-Hexadecyl-G ₄ :	C ₂₄ H ₄₀ O ₉	(483.99)
	2-0-Octadecyl-G ₄ :	C ₂₆ H ₅₄ O ₉	(510.70)
20	2-0-Oleyl-G ₄ :	C ₂₆ H ₅₂ O ₉	(508.69)
	2-0-Erucyl-G ₄ :	C ₃₀ H ₆₀ O ₉	(564.80)

Zwischenprodukte für die Synthese von Phospholipiden, die Tetraglycerine im polaren Bereich enthalten.

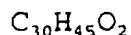
Verbindungen mit günstigen Schutzgruppen für diese Synthesen sind entsprechend den Erfahrungen für die Synthese von G₂- und G₁-Verbindungen Benzyl- und Tetrahydropyranylether.

30 1) 2-O-Benzyl-rac-G₁-1.3-0.0-(2-O-benzyl)-rac-G₂-1.3-0.0-(2-
0-benzyl)-rac-G₃-1.3-0.0-(1.2-isopropyliden)-rac-G₄:
C₃₆H₄₈O₉ (624.77)

Die zur Synthese von Phospholipiden mit G₄-Resten im polaren
35 Bereich wichtige Zwischenverbindung wird aus Formel IX, X =
Benzyl durch Öffnen des Epoxids mit Allylalkohol, anschließen-
der Benzylierung der freiwerdenden 2-OH-Gruppe und Entfernung

von Allyl hergestellt. Die Verbindung erscheint im Text als Formel X.

2. 2-0-THP-rac-G₁-1.3-0.0-(2-0-THP)-rac-G₂-1.3-0.0-(2-0-THP)-
 5 rac-G₃-1.3-0.0-(1.2-isopropyliden)-rac-G₄:



(607.75)

Zur Herstellung dieser Verbindung, die zur Darstellung ungesättigter Phospholipide mit G₄-Grundkörpern im polaren Bereich
 10 geeignet ist, geht man analog vor, wie bei der Herstellung der G₃-Verbindung. Man öffnet das Epoxid VII, X = THP mit Benzylalkohol, schützt die freiwerdende 2-OH-Gruppe mit THP und entfernt Benzyl mit H₂ (Pd/C-Katalyse). Die Verbindung wird im Text unter Formel XI genannt.

15 ZWISCHENPRODUKTE FÜR DIE SYNTHESSE VON PHOSPHOLIPIDEN, DIE OLIGOGLYCERINE IM POLAREN BEREICH ENTHALTEN UND EINE SN-1-VERKNÜPFUNG ZUM PHOSPHAT ERMÖGLICHEN (NATÜRLICHE KONFIGURATION)

20 Bei der bisherigen Herstellung der Verbindungen, die für einen Einbau in den polaren Bereich von Phospholipiden geeignet sind (Formeln III und V für G₂, Formeln VII und VIII für G₃, Formeln X und XI für G₄), wurde nicht darauf geachtet, daß in natürlichem
 25 Phosphatidylglycerin, d.h. in 1.2-Diacyl-sn-glycero-3-phospho-sn-1-glycerin, die Verknüpfung von Phosphat mit dem nicht acylierten Glycerin eine sn-1-Verknüpfung ist. Da die Liposomenbestandteile als Karrier von Arzneimitteln möglichst in natürlicher Konfiguration verwendet werden, wurden Synthesewege
 30 entwickelt, die auch eine sn-1-Konfiguration des polaren Oligoglycerins zulassen (Schema G).

sn-1-G₁-G₂-Verknüpfung

35 Die stereospezifische Verknüpfung kann analog zu den in der Literatur beschriebenen Verfahren durchgeführt werden (DE 31 30 867 A1; H. Eibl, Chem. Phys. Lipids 28 (1981) 1-5; H. Eibl

et al., Chem. Phys. Lipids 41 (1986) 53-63; H. Eibl et al., Chem. Phys. Lipids 47 (1988) 47-53).

Das Ausgangsprodukt für diese Verknüpfung ist 2-0-Benzyl-3-0-allyl-sn-glycerin, das nach Epoxidation durch Hydrolyse in das Diol umgewandelt wird. Nach Umsetzung mit H⁺/2.2-Dimethoxypropan entsteht 2-0-BE-sn-G₁-3.1-0.0-(1.2-isopropyliden)-rac-G₂, ein Molekül der Formel XII, das eine sn-1-Verknüpfung zur Phosphatgruppe in Phospholipiden ermöglicht und dem Racemat der Formel III entspricht.

sn-1-G₁-G₂-G₃-Verknüpfung

Das Ausgangsprodukt für diese Verknüpfung ist wieder 2-0-Benzyl-3-0-allyl-sn-glycerin. Nach Schutz der sn-1-Position mit THP wird epoxidiert und der Epoxidring mit 1.2-Isopropylidenglycerin geöffnet. Man benzyliert die frei werdende OH-Funktion in G₂, entfernt die THP-Schutzgruppe und erhält das Molekül der Formel XIII, das eine sn-1-Verknüpfung zur Phosphatgruppe in Phospholipiden ermöglicht. Das Molekül XIII entspricht dem Racemat der Formel VII.

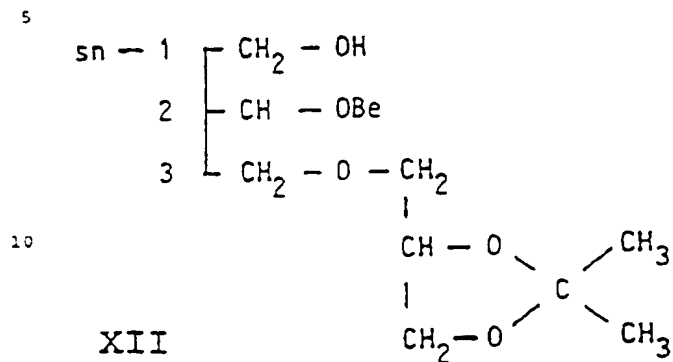
sn-1-G₁-G₂-G₃-G₄-Verknüpfung

Ausgangsprodukt ist wieder 2-0-Benzyl-3-0-allyl-sn-glycerin, um die sn-1-Verknüpfung zu gewährleisten. Nach Einführung der THP-Schutzgruppe wird epoxidiert und das Epoxid mit Allylalkohol geöffnet. Nach Epoxidation des Zwischenproduktes wird mit Isopropylidenglycerin geöffnet, die beiden freien OH-Gruppen benzyliert und THP entfernt. Man erhält XIV, das eine sn-1-Verknüpfung zum Phosphat ermöglicht und dem Racemat der Formel X entspricht.

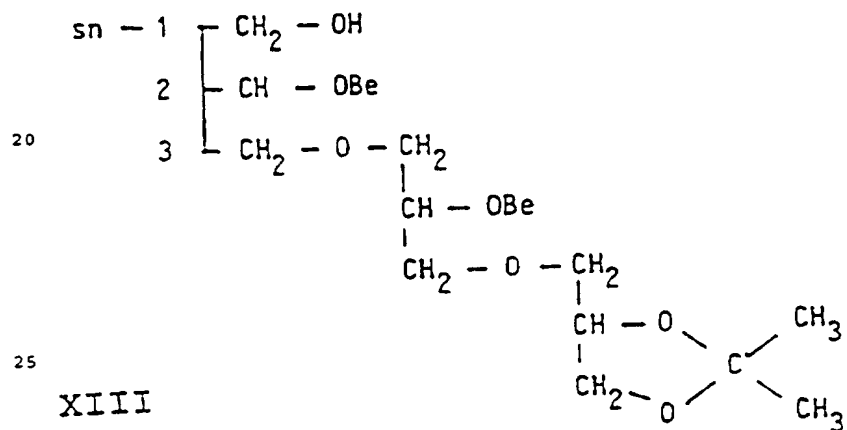
Wenn erwünscht, können entsprechend auch Verbindungen mit sn-3-G₁-G₂-, sn-3-G₁-G₂-G₃- oder sn-3-G₁-G₂-G₃-G₄-Verknüpfung zum Phosphat hergestellt werden. In diesem Falle muß in einer gleichen Sequenz von Reaktionen anstelle von 2-0-Benzyl-2-0-

allyl-sn-glycerin das enantiomere 2-O-Benzyl-1-O-allyl-sn-glycerin eingesetzt werden.

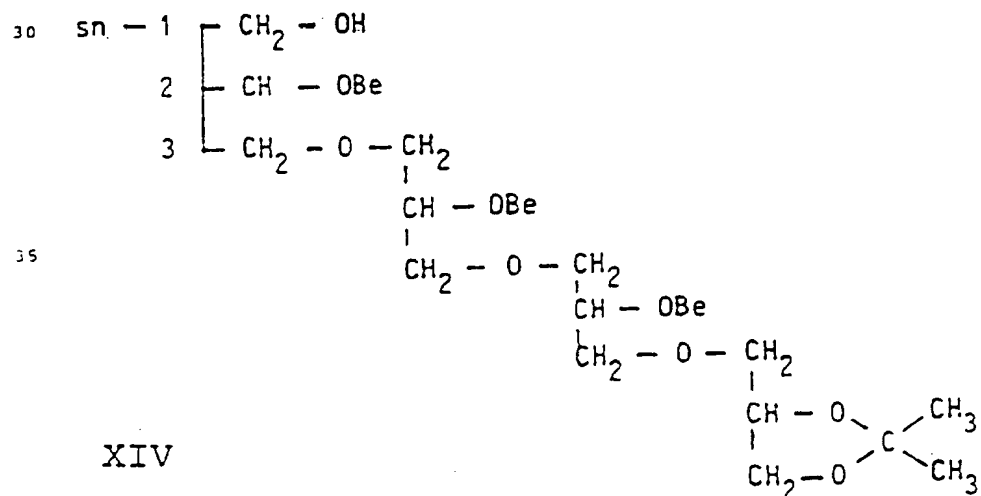
sn-1-G₁-G₂-Verknüpfung



sn-1-G₁-G₂-G₃-Verknüpfung



sn-1-G₁-G₂-G₃-G₄-Verknüpfung



ERSATZBLATT (REGEL 26)

Schema G: Bausteine für Phospholipide, die eine sn-1-G_x-Verknüpfung ermöglichen (x = 2 - 4). Ausgangsprodukt ist 2-O-Benzyl-3-O-allyl-sn-glycerin.

5 Beispiel 4f:

Zwischenprodukte, die Zuckeralkohole enthalten (allgemeine Beispiele)

Wichtige Zwischenprodukte sind hier vor allem solche Zuckeralkohole, die preislich günstig zu erwerben oder aus diesen durch einfache Umsetzungen erreicht werden können (siehe dazu beiliegende Tabelle). Interessant sind insbesondere D-Mannit als offene Form von Inosit, -Xylit, das bei einer Phosphorylierung am mittleren C-Atom keine optische Aktivität besitzt und das als 1.2; 4.5-Diisopropyliden-Xylit leicht zu erhalten ist, sowie meso-Erythrit. Als Schutzgruppen werden hier meistens Isopropyliden, Trityl in Kombination mit Benzyl oder Allyl eingesetzt. Auch die Tetrahydropyranyl-Schutzgruppe hat hier eine gewisse Bedeutung. Beispielhaft werden hier einige Möglichkeiten beschrieben.

1.2;4.5-Diisopropyliden-Xylit (allgemeines Beispiel für die Einführung der Isopropyliden-Schutzgruppe)

35 Xylit (1.0 Mol - 152 g) wird in 500 ml 2-Propanol aufgeschlämmt und Dimethoxypropan (3.0 Mol - 312 g) zugegeben. Man versetzt mit 6 g H₂SO₄ in 100 ml 2-Propanol und erwärmt auf 50 °C. Nach 30 Minuten ist alles gelöst. Man versetzt mit soviel konzentriertem Ammoniak, bis das Reaktionsgemisch einen pH-Wert von ungefähr 8 aufweist. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer in Vakuum wird der Rückstand in Hexan aufgenommen und auf -20 °C gekühlt. Es fallen schöne, weiße Kristalle aus, die abgesaugt und für die Phosphorylierung verwendet werden.

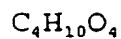
35

Summenformel: C₁₁H₁₉O₅ (MG 231.27)

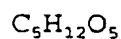
ber.: C, 57.13; H, 8.28; O, 34.59

gef.: C, 57.01; H, 8.27; O, -

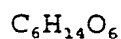
Strukturformeln einiger Zuckeralkohole:



meso-Erythrit	D-Threit	L-Threit
$ \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ H - C - OH \\ \\ H - C - OH \\ \\ CH_2OH \end{array} $	$ \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ HO - C - H \\ \\ H - C - OH \\ \\ CH_2OH \end{array} $	$ \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ H - C - OH \\ \\ HO - C - H \\ \\ CH_2OH \end{array} $



Adonit (Ribitol)	D(+)-Arabit	L(-)-Arabit	Xylit (Xylitol)
$ \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ H - C - OH \\ \\ H - C - OH \\ \\ H - C - OH \\ \\ CH_2OH \end{array} $	$ \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ HO - C - H \\ \\ H - C - OH \\ \\ H - C - OH \\ \\ CH_2OH \end{array} $	$ \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ H - C - OH \\ \\ HO - C - H \\ \\ HO - C - H \\ \\ CH_2OH \end{array} $	$ \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ H - C - OH \\ \\ HO - C - H \\ \\ H - C - OH \\ \\ CH_2OH \end{array} $



Dulcitol (Galactitol)	D-Mannit	D-Sorbit
$ \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ H - C - OH \\ \\ HO - C - H \\ \\ HO - C - H \\ \\ H - C - OH \\ \\ CH_2OH \end{array} $	$ \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ HO - C - H \\ \\ HO - C - H \\ \\ H - C - OH \\ \\ H - C - OH \\ \\ CH_2OH \end{array} $	$ \begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ H - C - OH \\ \\ HO - C - H \\ \\ H - C - OH \\ \\ H - C - OH \\ \\ CH_2OH \end{array} $

1.2;3.4-Diisopropyliden-5-benzyl-D-Mannit (allgemeines Beispiel für die Verwendung von Tritylschutzgruppen in Verbindung mit Benzylschutzgruppen)

5 Ausgehend von 1.2;3.4;5.6-Triisopropyliden-D-Mannit (MG 302.36), das analog zur Herstellung des Xylit-Derivates erhalten wurde, wird durch vorsichtige Abspaltung der Schutzgruppe in etwa 30 %-iger Ausbeute 1.2.3.4-Diisopropyliden-D-Mannit erhalten. Triisopropyliden-D-Mannit (1.0 Mol - 302 g) wird in
10 600 ml CH₃OH gelöst, mit Amberlyst 15 (5 g) und 70 g H₂O versetzt. Man erwärmt auf 50 °C und rührt die Lösung bei dieser Temperatur für 40 Minuten (Edukt, Rf 0.9; 1.2;3.4-Derivat, Rf 0.7; 3.4-Derivat, Rf 0.1 in CHCl₃/CH₃OH 1:1), kühlt auf 20 °C und filtriert zu 7,5 ml 25 % Ammoniak in 25 ml 2-Propanol (pH
15 ~ 8). Beim Abkühlen auf 4 °C fällt das Ausgangsprodukt aus und kann zurückgewonnen werden (ca. 120 g, ~ 40 %). Das Filtrat wird einrotiert und durch Chromatographie an Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt) gereinigt. Man erhält 84 g (~ 32 %) an 1.2;3.4-Diisopropyliden-D-Mannit, das aus Hexan kristallin
20 erhalten werden kann.

Summenformel: C₁₂H₂₂O₆ (MG 262.30)

ber.: C, 54.95; H, 8.45; O, 36.60

gef.: C, 54.89; H, 8.34; O. -

25

Umsetzung von 1.2;3.4-Diisopropyliden-D-Mannit mit Tritylchlorid und Benzylchlorid (allgemeines Beispiel für die Tritylierung und anschließende Alkylierung)

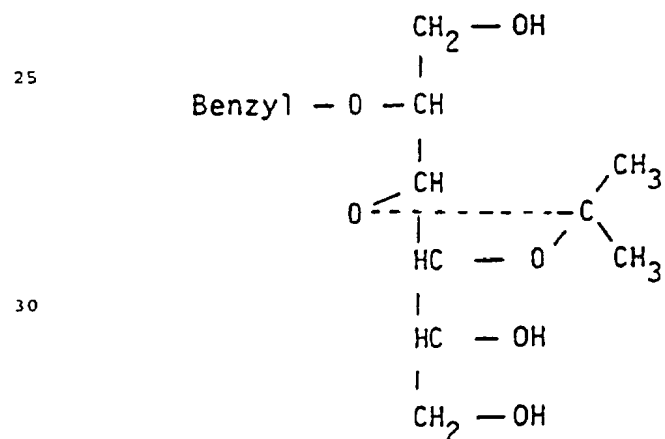
30 1.2;3.4-Diisopropyliden-D-Mannit (0.2 Mol - 52 g) wird in 300 ml Toluol gelöst, mit Triethylamin (0,30 Mol - 30 g) versetzt und unter Rückfluß gekocht. Man tropft Tritylchlorid (MG 278.78; Mol - 64 g) in 200 ml Toluol zu und kocht weitere 60 Minuten unter Rückfluß (Edukt, Rf 0.7; Produkt, Rf 0.90 in
35 CHCl₃/CH₃OH 10:1). Die Reaktion ist dann abgeschlossen. Man kühlt auf 20 °C, filtriert ausgefallenes Triethylaminhydrochlorid ab und rotiert das Filtrat ein. Der obige Rückstand wird in 400 ml THF aufgenommen, mit Benzylchlorid (0.3 Mol -

38 g) versetzt und unter Rückfluß gekocht. Man tropft K-tert.-Butylat (0.25 Mol - 28 g) - gelöst in 200 ml THF - ein und arbeitet das Reaktionsgemisch nach 1 Stunde auf (Edukt, Rf 0.90; Produkt, Rf 1.00 in $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 10:1). Man extrahiert das Reaktionsgemisch nach Zusatz von 300 ml Diisopropylether mit 600 ml H_2O , nimmt die obere Phase ab und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Der obige Rückstand wird direkt weiterverwendet.

10 Abspaltung der Tritylschutzgruppe unter Erhalt der 3.4-Isopropyliden-Schutzgruppe (allgemeines Beispiel)

Der ölige Rückstand der vorhergehenden Reaktion (~0.2 Mol) wird in 600 ml Aceton/ CH_3OH 1:1 gelöst und mit 3 ml H_2SO_4 versetzt. Man rührt bei 40 °C für 40 Minuten und beobachtet eine vollständige Abspaltung der Trityl- und der 1.2-Isopropyliden-Schutzgruppe (Edukt, Rf 0.95; Produkt, Rf 0.15 in Ether). Das Reaktionsgemisch wird mit Ammoniak auf pH ~ 8 gebracht, filtriert und einrotiert. Der Rückstand wird in Kieselgel chromatographiert und aus Hexan kristallisiert.

2-O-Benzyl-3.4-isopropyliden-D-Mannit



35

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_6$ (MG 312.36)

ber.: C, 61.52; H, 7.74; O, 30.73

gef.: C, 61.44; H, 7.72; O, -

Wie in Beispiel 4c angegeben, kann die Isopropyliden-Schutzgruppe in 5.6-Position wieder eingeführt werden. Es entsteht ein zentrales Zwischenprodukt für die Synthese von Phosphatidyl-D-Mannit-Verbindungen, 2-O-Benzyl-3.4;5.6-diisopropyliden-D-Mannit.

Summenformel: $C_{19}H_{28}O_6$ (MG 352.42)

ber.: C, 64.75; H, 8.01; O, 27.24

gef.: C, 64,68; H, 7.94; O, -

10

Bausteine aus Zuckeralkoholen, die durch Kombination einer Perjodatabspaltung eines vicinalen Diols und Reduktion des entstehenden Aldehyds mit Natriumborhydrid erhalten werden (allgemeines Beispiel)

15

1.2:3.4-Diisopropyliden-D-Mannit (0.2 Mol - 26 g) wird nach H. Eibl, Chem. Phys. Lipids 28 (1981) 1-5, in 200 ml CH_3OH gelöst und zu einer Lösung von 0.2 Mol Natriummetaperjodat in 500 ml Wasser gegeben. Die Temperatur soll 30 °C nicht übersteigen. Nach 15 Minuten ist die Reaktion beendet. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches wird mit 5 M KOH in Wasser auf pH = 8 erhöht. Die ausgefallenen Salze werden abfiltriert und der entstandene Aldehyd mit Natriumborhydrid (0,25 Mol) reduziert. Man erhält in > 90 %-iger Ausbeute 1.2:3.4-Diisopropyliden-D-Lyxit, das mit 600 ml Chloroform extrahiert wird. Die Chloroform-Phase wird einrotiert und das Produkt aus Hexan kristallisiert.

Summenformel: $C_{11}H_{19}O_5$ (MG 231.27)

30

ber.: C, 57.13; H, 8.28; O, 34.59

gef.: C, 57.07; H, 8.21, O, -

Durch Verwendung dieser unterschiedlichen Möglichkeiten, Monoisopropylidenabspaltung, Perjodatabspaltung der vicinalen Diole zu den Aldehyden und Natriumborhydridreduktion in Kombination mit der Variation Trityl/Alkyl können die unterschiedlichsten geschützten Zuckeralkohole erhalten werden, die

durch Acylierung oder Phosphorylierung in interessante Alkyl-, Acyl- oder Phosphatidylverbindungen umgewandelt werden können.

Herstellung einfacher Ester- und Etherderivate aus den geschilderten Oligoglycerinen und Zuckeralkoholen (allgemeine Beschreibung)

Möglichkeiten der Veresterung oder Veretherung mit anschließender Abspaltung der Schutzgruppen wurden in verschiedenen Publikationen beschrieben. In den im folgenden aufgeführten Artikeln finden sich zudem unterschiedliche Methoden der Phosphorylierung. Diese Methoden können hier analog verwendet werden.

15 Eibl, H.

Synthesis of glycerophospholipids
Chem. Phys. Lipids 26 (1980) 405-429

Eibl, H.

20 Phospholipid Synthesis

In: Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications (C.G. Knight, editor) Elsevier, Amsterdam (1981) 19-50

25 Eibl, H. and Kovatchev, S.

Preparation of phospholipids and of their analogs by phospholipase D. In: Methods of Enzymology. Vol. 72. Ed. J.M. Lowenstein, Academic Press, New York (1981) 632-639

30 Eibl, H.: Phospholipide als funktionelle Bausteine biologischer Membranen Angew. Chemie 96 (1984) 247-262

Eibl, H.: Phospholipids as functional constituents of biomembranes Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 23 (1984) 257-271

35

Eibl, H. Phospholipid synthesis: Oxazaphospholanes and dioxaphospholanes as intermediates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 4074-4077

Eibl, H. and Wooley, P.: Synthesis of enantiomerically pure glyceryl esters and ethers. I. Methods employing the precursor 1,2-isorpropylidene-sn-glycerol. Chem. Phys. Lipids 41 (1986) 53-63

5

Eibl, H. and Wooley, P.: Synthesis of enantiomerically pure glyceryl esters and ethers. II. Methods employing the precursor 3,4-isopropylidene-D-mannitol. Chem. Phys. Lipids 47 (1988) 47-53

10

Eibl, H. and Wooley, P.: A general synthetic method for enantiomerically pure ester and ether lysophospholipids. Chem. Phys. Lipids 47 (1988) 63-68

15 Wooley, P. and Eibl, H.: Synthesis of enantiomerically pure phospholipids including phosphatidylserine and phosphatidylglycerol. Chem. Phys. Lipids 47 (1988) 55-62

Beispiel 4g:

20

Zwischenprodukte zur Synthese von Phospholipiden, die Zuckeralkohole im polaren Bereich enthalten.

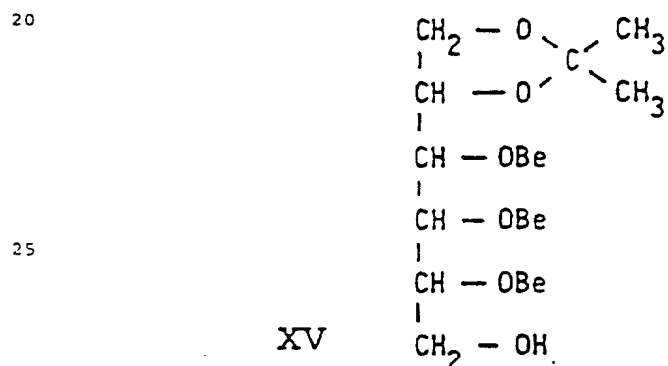
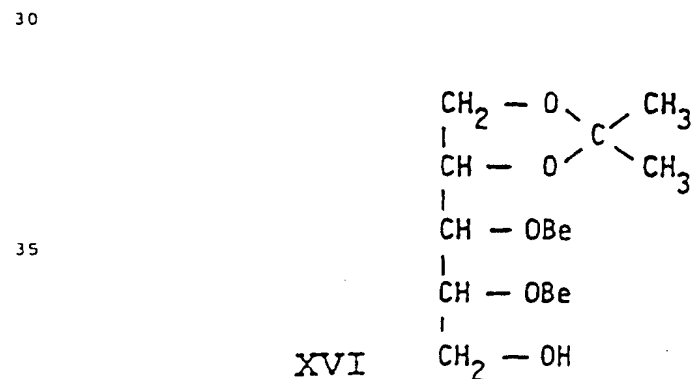
Wie bisher beschrieben, hat die Einführung im polaren Bereich
25 von Phospholipiden über Oligoglycerine einen ausgeprägten Effekt auf die Blutzirkulation, wenn diese Substanzen als Liposomenbestandteile eingesetzt werden. Mit gleichem Ergebnis können aber anstelle der Oligoglycerine auch Zuckeralkohole verwendet werden, z.B. Phosphorsäureester von D-Mannit, D-
30 Lyxit und D-Threit. Diese Verbindungen können mit geeigneten Schutzgruppen (siehe dazu Schema H) auf die für Oligoglycerine beschriebene Weise in Phospholipide eingeführt werden. Bei den beschriebenen Derivaten führt die Kopplung mit Phospholipiden wieder zu einer sn-1-Verknüpfung der Phosphorsäure mit dem
35 Zuckeralkohol.

D-Mannit-Derivat

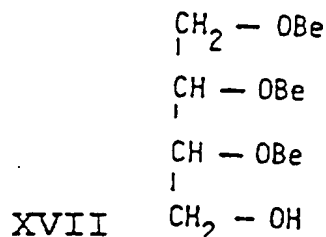
Aus 1.2.6.5-Diisopropyliden-D-Mannit kann durch Benzylierung
 5 in 3.4-Position und Abspaltung der Isopropyliden-Schutzgruppen
 3.4-0.0-Dibenzyl-D-Mannit hergestellt werden. Nach Einführung
 der Isopropyliden-Schutzgruppe in 1.2-Position, Tritylierung
 und Benzylierung der freien OH-Gruppe erhält man nach Abspal-
 tung der Tritylgruppe die Verbindung XV, die in den polaren
 10 Bereich von Phospholipiden eingebaut werden kann.

D-Lyxit-Derivat

1.2-Isopropyliden-3.4-0.0-dibenzyl-D-mannit (siehe oben) wird
 15 mit Perjodsäure gespalten und mit NaBH₄ zum Alkohol XVI redu-
 ziert. Diese Verbindung kann in den polaren Bereich von
 Phospholipiden eingebaut werden.

D-Mannit-Derivat (6-Hydroxylgruppen)D-Lyxit-Derivat (5-Hydroxylgruppen; aus D-Mannit)

D-Threit-Derivat (4-Hydroxylgruppen; aus D-Mannit)



10 Schema H: Polyalkohole mit mindestens 4 Hydroxylgruppen zum Einbau in den polaren Bereich von Phospholipiden

D-Threit-Derivat

15 Die Verbindung XVI wird durch Benzylierung in 1.2-Isopropyliden-3.4.5-0.0.0-Tribenzyl-D-Lyxit umgewandelt. Nach Abspaltung der Isopropyliden-Schutzgruppe, Perjodsäurespaltung und Reduktion zum Alkohol erhält man XVII. Diese kann in gewohnter Weise in den polaren Bereich von Phospholipiden eingebaut
20 werden.

Phospholipide, die Oligoglycerine im polaren Bereich enthalten

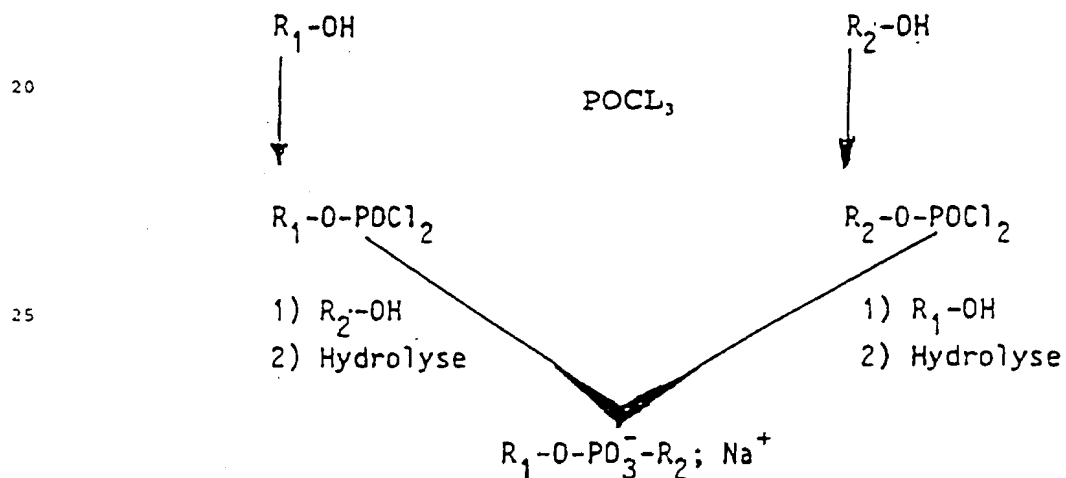
Wir haben in früheren Publikationen beschrieben, wie auf einfache Weise Phospholipide aus Diacylglycerinen mit gesättigten
25 und ungesättigten Fettsäureketten, mit zwei gleichen oder zwei unterschiedlichen Fettsäureketten hergestellt werden können. (DE 32 39 817 Ar; P. Woolley et al. Chem. Phys. Lipids 47 (1988) 55-62; H. Eibl et al., Chem. Phys. Lipids 47 (1988) 63-
30 68). Entsprechend können auch Acyl/Alkyl- oder Alkyl/Acylglycerine als Ausgangsprodukt verwendet werden. Dagegen sind Phospholipide, die Dialkylglycerine enthalten, metabolisch extrem stabil und können praktisch nicht resorbiert werden.

35 Die genannten Verbindungen können prinzipiell nach zwei unterschiedlichen Methoden dargestellt werden. Dies ergibt sich aus der Tatsache, daß aus zwei Alkoholen, R₁-OH und R₂-OH, ein Phosphorsäurediester hergestellt werden soll.

Die Alkohole unter R_1 -OH sind Alkohole, die ein Glyceringrundgerüst mit zwei Fettsäureketten und eine freie Hydroxylgruppe enthalten. Sie können aber auch nur eine Fettsäurekette und eine zusätzliche Schutzgruppe, meist Benzyl, zur Herstellung von Monoacrylphospholipiden enthalten, R_1 -OH kann aber auch einen Alkohol mit einem einfachen Alkylrest mit einer oder zwei cis-Doppelbindungen darstellen.

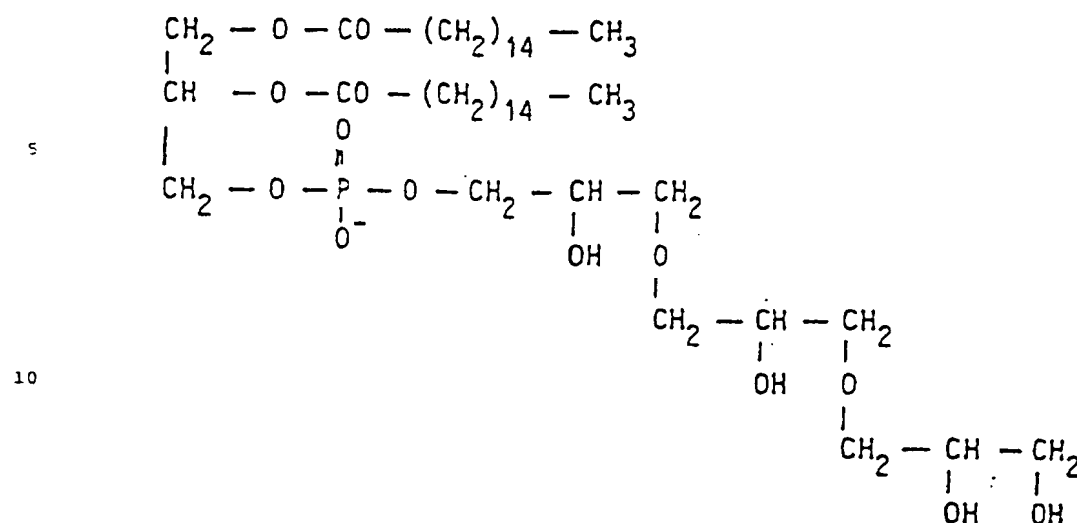
Die Alkohole unter R_2 -OH sind Alkohole, die im bisherigen Text als G_2 , G_3 und G_4 bezeichnet wurden. Sie sind unter den Strukturformeln III und V (für G_2), VII und VIII (für G_3) und X bis XIV (für G_4) genannt. Entsprechend können auch die Zuckeralkoholderivate XV bis XVII eingesetzt werden.

Wie zwei Alkohole R_1 -OH und R_2 -OH in guten Ausbeuten zur Herstellung von Phosphorsäurediestern eingesetzt werden können, ist in Schema G beschrieben.



30 Beispielsweise ergibt sich für R_1 = 1.2-Dipalmitoyl-sn-G und R_2 = Formel XI nach Entfernung der Schutzgruppen folgende Struktur:

35



15 Schema G: Phosphorsäurediester der Formel $\text{R}_1\text{O}-\text{PO}_3^- - \text{R}_2$; Na^+

Als Phosphorylierungsmittel wird Phosphoroxychlorid eingesetzt. Aus den beiden über Phosphat zu verknüpfenden Alkoholen R_1OH oder R_2OH wird zunächst das entsprechende Phosphorsäuredi-
 20 chlorid hergestellt, das durch Umsetzung mit dem jeweils anderen Alkohol zum Phosphorsäuremonochlorid umgesetzt wird. Leicht basische Hydrolyse führt dann zu den Phosphorsäuredi-
 estern, die nach Abspaltung der Schutzgruppen beispielsweise in XVIII übergehen, in 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho- G_1 -
 25 G_2 - G_3 - G_4 ; Na^+ -Salz.

Die in der Folge beschriebenen Beispiele können durch andere Kombination der Fettsäureketten oder durch Einführung weiterer Fettsäuren, auch synthetischer und natürlicher Herkunft, be-
 30 liebig erweitert werden. Die hergestellten Phosphatidyl-Oligoglycerine können je nach Bedarf und nach Einstellung auf eine gewünschte Eigenschaft im Oligoglycerinbereich auch noch weitere Alkylketten oder auch Fettsäurereste enthalten.

35 Die hier vorgestellten Verfahren, basierend auf Oligoglycerinen können also in vielfältiger Weise eingesetzt und modifiziert werden, um die Eigenschaften von Liposomen zu variieren und zu beeinflussen. In Analogie zu den

Hexydecylphosphocholinen den Erucylphosphocholinen sind diese Substanzen möglicherweise aber auch wichtige biologisch aktive Moleküle, die die Signaltransduktion und damit zelluläre Funktionswege beeinflussen.

5

Beispiele für Phospho - G₁ - G₂- Verbindungen

1. 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂;

10 Na⁺-Salz: C₄₁H₈₀NaO₁₂P (819.04)
2. 1.2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂;

15 Na⁺-Salz: C₃₇H₇₂NaO₁₂P (762.93)
3. 1.2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂;

Na⁺-Salz: C₄₅H₈₈NaO₁₂P (875.14)
- 20 4. 1-Palmitoyl-2-lauroyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂;

Na⁺-Salz: C₃₇H₇₂NaO₁₂P (762.93)
5. 1-Stearoyl-2-lauroyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂;
25

Na⁺-Salz: C₃₉H₇₆NaO₁₂P (790.98)
6. 1.2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂;

30 Na⁺-Salz: C₄₅H₈₄NaO₁₂P (871.11)
7. 1.2-Dierucyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂;

Na⁺-Salz: C₅₃H₁₀₀NaO₁₂P (983.32)
- 35 8. 1-Stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂;

Na⁺-Salz: C₄₅H₈₆NaO₁₂P (873.13)
- 40 9. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂;

Na⁺-Salz: C₄₃H₈₂NaO₁₂P (845.07)
10. 1-Stearoyl-2-myristoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂;
45

Na⁺-Salz: C₄₁H₈₀NaO₁₂P (819.04)
11. 1-Stearoyl-2-palmitoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂;

50 Na⁺-Salz: C₄₃H₈₄NaO₁₂P (847.09)

12.	1-Myristoyl-sn-glycero-3-phospho-G ₁ -G ₂ ;	
	Na ⁺ -Salz:	$C_{23}H_{46}NaO_{11}P$ (552.57)
13.	1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phospho-G ₁ -G ₂ ;	
	Na ⁺ -Salz:	$C_{25}H_{50}NaO_{11}P$ (580.62)
14.	1-Stearoyl-sn-glycero-3-phospho-G ₁ -G ₂ ;	
	Na ⁺ -Salz:	$C_{27}H_{54}NaO_{11}P$ (608.68)
15.	Erucyl-phospho-G ₁ -G ₂ ;	
	Na ⁺ -Salz:	$C_{28}H_{56}NaO_8P$ (574.71)
16.	Octadecyl-phospho-G ₁ -G ₂ ;	
	Na ⁺ -Salz:	$C_{24}H_{50}NaO_8P$ (520.62)
17.	Hexadecyl-phospho-G ₁ -G ₂ ;	
	Na ⁺ -Salz:	$C_{22}H_{46}NaO_8P$ (492.56)
18.	Tetradecyl-phospho-G ₁ -G ₂ ;	
	Na ⁺ -Salz:	$C_{20}H_{42}NaO_8P$ (464.51)
19.	Oleyl-phospho-G ₁ -G ₂ ;	
	Na ⁺ -Salz:	$C_{24}H_{48}NaO_8P$ (518.60)
20.	1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phospho-G ₁ -G ₂ ;	
	Na ⁺ -Salz:	$C_{28}H_{58}NaO_{10}P$ (608.72)

Beispiele für Phospho-G₁-G₂-G₃-Verbindungen

1.	1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-G ₁ -G ₂ -G ₃ ;	
	Na ⁺ -Salz:	$C_{44}H_{86}NaO_{14}P$ (893.12)
2.	1.2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-G ₁ -G ₂ -G ₃ ;	
	Na ⁺ -Salz:	$C_{48}H_{94}NaO_{14}P$ (949.22)
3.	1-Palmitoyl-2-lauroyl-sn-glycero-3-phospho-G ₁ -G ₂ -G ₃ ;	
	Na ⁺ -Salz:	$C_{40}H_{78}NaO_{14}P$ (837.01)
4.	1-Stearoyl-2-lauroyl-sn-glycero-3-phospho-G ₁ -G ₂ -G ₃ ;	
	Na ⁺ -Salz:	$C_{42}H_{82}NaO_{14}P$ (865.06)

5. 1.2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂-G₃;
Na⁺-Salz: C₄₈H₉₀NaO₁₄P (945.19)
- 5 6. 1.2-Dierucyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂-G₃;
Na⁺-Salz: C₅₆H₁₀₆NaO₁₄P (1057.40)
7. 1-Stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂-G₃;
10 Na⁺-Salz: C₄₈H₉₂NaO₁₄P (947.21)
8. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂-G₃;
15 Na⁺-Salz: C₄₆H₈₈NaO₁₄P (919.148)
9. 1-Stearoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂-G₃;
Na⁺-Salz: C₃₀H₆₀NaO₁₃P (682.76)
- 20 10. Erucyl-phospho-G₁-G₂-G₃;
Na⁺-Salz: C₃₁H₆₂NaO₁₀P (648.79)
- 25 11. Octadecyl-phospho-G₁-G₂-G₃;
Na⁺-Salz: C₂₇H₅₆NaO₁₀P (594.69)
12. Hexadecyl-phospho-G₁-G₂-G₃;
30 Na⁺-Salz: C₂₅H₅₂NaO₁₀P (566.64)
13. 3-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-1-phospho-G₁-G₂-G₃;
35 Na⁺-Salz: C₃₁H₆₄NaO₁₂P (682.80)

Beispiele für Phospho-G₁-G₂-G₃-G₄-Verbindungen

- 40 1. 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂-G₃-G₄;
Na⁺-Salz: C₄₇H₉₂NaO₁₆P (967.20)
- 45 2. 1.2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂-G₃-G₄;
Na⁺-Salz: C₅₁H₁₀₀NaO₁₆P (1023.30)
3. 1-Stearoyl-2-lauroyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂-G₃-G₄;
50 Na⁺-Salz: C₄₅H₈₈NaO₁₆P (939.14)
4. 1.2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂-G₃-G₄;
55 Na⁺-Salz: C₅₁H₉₆NaO₁₆P (1019.27)

5. 1.2-Dierucyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂-G₃-G₄;

Na⁺-Salz: C₅₉H₁₁₂NaO₁₆P (1131.48)

5 6. 1-Stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-G₁-G₂-G₃-G₄;

Na⁺-Salz: C₅₁H₉₈NaO₁₆P (1021.29)

7. Erucyl-phospho-G₁-G₂-G₃-G₄;

10

Na⁺-Salz: C₃₄H₆₈NaO₁₂P (722.87)

Beispiele für Phospho-sn-G₁-Verknüpfungen

15

sn-1-G₁-G₂:

1. 1.2-Dipylmitoyl-sn-glycero-3-phospho-sn-1-G₁-G₂;

20

Na⁺-Salz: C₄₁H₈₀NaO₁₂P (819.04)

2. 1.2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-sn-1-G₁-G₂;

25

Na⁺-Salz: C₄₅H₈₈NaO₁₂P (875.14)

3. 1-Stearoyl-2-lauroyl-sn-glycero-3-phospho-sn-1-G₁-G₂;

Na⁺-Salz: C₃₉H₇₆NaO₁₂P (790.98)

30

4. 1-Stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-sn-1-G₁-G₂;

Na⁺-Salz: C₄₅H₈₆NaO₁₂P (873.13)

35

sn-1-G₁-G₂-G₃:

1. Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-sn-1-G₁-G₂-G₃;

40

Na⁺-Salz: C₄₄H₈₆NaO₁₄P (893.12)

2. 1.2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-sn-1-G₁-G₂-G₃;

Na⁺-Salz: C₄₈H₉₄NaO₁₄P (949.22)

45

sn-1-G₁-G₂-G₃-G₄:

1. 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-sn-1-G₁-G₂-G₃-G₄;

50

Na⁺-Salz: C₄₇H₉₂NaO₁₆P (967.20)

2. 1.2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-sn-1-G₁-G₂-G₃-G₄;

Na⁺-Salz: C₅₁H₁₀₀NaO₁₆P (1023.30)

55

Beispiele für Verknüpfungen mit ZuckeralkoholenPhospho-D-Mannit-Verbindungen

- 5 1. 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-D-mannit;
Na⁺-Salz: $C_{41}H_{80}NaO_{13}P$ (835.03)
- 10 2. 1.2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-D-mannit;
Na⁺-Salz: $C_{45}H_{88}NaO_{13}P$ (891.13)
- 15 3. 1-Palmitoyl-2-lauroyl-sn-glycero-3-phospho-D-mannit;
Na⁺-Salz: $C_{37}H_{72}NaO_{13}P$ (788.92)
4. 1-Stearoyl-2-lauroyl-sn-glycero-3-phospho-D-mannit;
20 Na⁺-Salz: $C_{39}H_{76}NaO_{13}P$ (806.97)
5. 1-Stearoyl-2-myristoyl-sn-glycero-3-phospho-D-mannit;
Na⁺-Salz: $C_{41}H_{80}NaO_{13}P$ (835.03)
- 25 6. 1-Stearoyl-sn-glycero-3-phospho-D-mannit;
Na⁺-Salz: $C_{27}H_{54}NaO_{12}P$ (624.67)
- 30 7. Octadecyl-phospho-D-mannit;
Na⁺-Salz: $C_{24}H_{50}NaO_9P$ (536.61)
8. 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phospho-D-mannit;
35 Na⁺-Salz: $C_{28}H_{56}NaO_{11}P$ (624.71)

Phospho-D-Lyxit-Verbindungen

- 40 1. 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-D-lyxit;
Na⁺-Salz: $C_{40}H_{78}NaO_{12}P$ (805.00)
- 45 2. 1.2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-D-lyxit;
Na⁺-Salz: $C_{44}H_{86}NaO_{12}P$ (861.10)
- 50 3. 1-Palmitoyl-2-lauroyl-sn-glycero-3-phospho-D-lyxit;
Na⁺-Salz: $C_{36}H_{70}NaO_{12}P$ (758.89)
4. 1-Stearoyl-2-lauroyl-sn-glycero-3-phospho-D-lyxit;
55 Na⁺-Salz: $C_{38}H_{74}NaO_{12}P$ (776.94)

5. 1-Stearoyl-2-myristoyl-sn-glycero-3-phospho-D-lyxit;

Na⁺-Salz: C₄₀H₇₈NaO₁₂P (805.00)

5

Phospho-D-Threit-Verbindungen

1. 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-D-threit;

10 Na⁺-Salz: C₃₉H₇₆NaO₁₁P (774.97)

2. 1.2-Distearoyl-sn-glycero-3-phospho-D-threit;

Na⁺-Salz: C₄₃H₈₄NaO₁₁P (831.07)

15

3. 1-Stearoyl-2-lauroyl-sn-glycero-3-phospho-D-threit;

Na⁺-Salz: C₃₇H₇₂NaO₁₁P (746.91)

20

4. 1-Stearoyl-2-myristoyl-sn-glycero-3-phospho-D-threit;

Na⁺-Salz: C₃₉H₇₆NaO₁₁P (774.97)

Beispiel 4h:

25

Phosphorylierungsschritte (allgemeine Vorschrift) am Beispiel
der Darstellung von 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-gly-
ceroglycerin, Na⁺-Salz

30 In einem 1 l Dreihalskolben werden POCl₃ (0.1 Mol - 15.3 g) in
15 ml THF vorgelegt. Unter starkem Rühren und Eiskühlung
tropft man 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycerin (0.1 Mol - 57 g) in 100
ml THF und separat Triethylamin (0.11 Mol - 11 g) so ein, daß
stets ein leichter Überschuß von Triethylamin über 1.2-Di-
35 palmitoyl-sn-glycerin vorhanden ist, um den sich bildenden
Chlorwasserstoff aufzunehmen. Die Temperatur im Reaktionsge-
misch soll dabei 16 °C nicht übersteigen. Nach dem Eintropfen
beläßt man noch 30 Minuten bei 16 °C und überprüft durch DC-
Chromatographie die Vollständigkeit der Reaktion. (1.2-Di-
40 palmitoyl-sn-glycerin, R_F 0.8; 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-
phosphorsäuredichlorid wird durch Methanolyse in den entspre-
chenden Phosphorsäuredimethylester umgewandelt, R_f 0.4 in
Ether.)

Der zweite Phosphorylierungsschritt wird nun mit einem geschützten Oligoglycerin durchgeführt. Hier wird die Umsetzung mit 2-O-Benzyl-rac-G₁-1.3-0.0-1.2-isopropyliden-rac-G₂ beschrieben. Man tropft in das Reaktionsgemisch mit 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorsäuredichlorid obigen Alkohol (0.105 Mol - 31 g) und Triethylamin (0.13 - 13 g) in 100 ml THF so ein, daß die Temperatur im Reaktionsgemisch 40 °C nicht übersteigt. Nach 3 Stunden bei 40 °C ist die Reaktion abgeschlossen (Ausgangsprodukt als Phosphorsäuredimethylester, Rf 0.4; Produkt als Methylester, Rf 0.7 in Ether). Man filtriert vom ausgefallenen Triethylaminhydrochlorid ab und hydrolysiert das Reaktionsgemisch, im wesentlichen 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-2-O-benzyl-rac-glycero-1.3-0.0-1.2-isopropyliden-rac-glycerin-monochlorid neben nicht vollständig umgesetztem 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorsäuredichlorid, mit 26 g Na₂CO₃ gelöst in 260 ml H₂O. Nach 4 Stunden wird mit 400 ml Diisopropylether versetzt und die obere Phase, die das Produkt enthält, so weit einrotiert, bis sich erste Kristalle bilden. Nun versetzt man mit 500 ml Aceton und saugt bei 20 °C die gebildeten Kristalle ab. Das Filtrat enthält das geschützte Phosphatidylglyceroglycerin, Na⁺-Salz (Rf 0.6 in CHCl₃/CH₃OH/Eisessig/H₂O 600:60:20:5). Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man 48 g Rohprodukt, das in 140 ml Essigsäure und 60 ml H₂O für 30 Minuten auf 60 - 70 °C erwärmt wird (Abspaltung der Isopropylidenschutzgruppe). Man versetzt mit 500 ml CHCl₃, 600 ml CH₃OH und 400 ml H₂O und schüttelt gut durch. Die untere CHCl₃-Phase wird nochmals mit 600 ml CH₃OH und 500 ml H₂O gewaschen, dabei aber so viel Na₂CO₃ zusetzen, daß der pH-Wert der wäßrigen Phase 6 erreicht. Die untere Chloroformphase wird einrotiert und der Rückstand in 400 ml THF aufgenommen. Zur Entfernung der Benzylschutzgruppe wird die Lösung mit 6 g Pd/C versetzt und in H₂-Atmosphäre debenzyliert. Die Reaktion ist nach etwa 4 Stunden beendet. Man filtriert vom Katalysator ab, entfernt das Lösungsmittel und nimmt den Rückstand (~ 30 g) in 100 ml CHCl₃ auf. Man versetzt mit 900 ml Aceton und saugt die entstehenden Kristalle ab. Man erhält ein weißes Pulver, 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-glycerin, Na⁺-Salz, Ausbeute: 26 g (~ 32 %).

Summenformel: $C_{41}H_{80}NaO_{12}P$ (MG 819.04)

ber.: C, 60.13; H, 9.85; Na, 2.81; O, 23.44; P, 3.78

gef.: C, 60.01; H, 9.79; Na, - ; O, - ; P, 3.69

3 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-glyceroglycerin,
Na⁺-Salz

Summenformel: $C_{44}H_{86}NaO_{14}P$ (MG 893.12)

ber.: C, 59.17; H, 9.71; Na, 2.57; O, 25.08; P, 3.47

gef.: C, 59.11; H, 9.62; Na, - ; O, - ; P, 3.45

10

1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-glyceroglycerin,
Na⁺-Salz

Summenformel: $C_{47}H_{92}NaO_{16}P$ (MG 967.20)

ber.: C, 58.37; H, 9.59; Na, 2.38; O, 26.47; P, 3.20

15

gef.: C, 58.29; H, 9.53; Na, - ; O, - ; P, 3.19

Für die Herstellung von Phosphatidyl-oligoglycerinen mit einer aliphatischen Kette, den sogenannten Lysophosphatidyl-oligoglycerinen, kann von Verbindungen ausgegangen werden, die in
20 der sn-2-Position des Glycerins eine Benzylethergruppe tragen, z.B. 1-Palmitoyl-2-O-benzyl-sn-glycerin, 1-Stearoyl-2-O-benzyl-sn-glycerin, 1-O-Hexadecyl-2-O-benzyl-sn-glycerin, 1-O-Octadecyl-2-O-benzyl-sn-glycerin usw. Die Herstellung dieser Verbindungen haben wir in den Publikationen H. Eibl und P.
25 Woolley, Chem. Phys. Lipids 41 (1986) 53-63 und Chem. Phys. Lipids 47 (1988) 55-62 beschrieben. Diese Verbindungen werden in der für die Herstellung von 1.2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-glyceroglycerin, Na⁺-Salz, beschriebenen Weise phosphoryliert und mit den geschützten Oligoglycerinen umgesetzt. Die
30 Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt analog. Im letzten Schritt erfolgt durch katalytische Hydrogenolyse mit Pd/C (5 % auf Aktivkohle) sowohl die Abspaltung der Benzylgruppen im Oligoglycerinbereich wie am Glycerin, das eine Acyl- oder Alkylgruppe trägt (siehe dazu die Beispiele).

35

Die Herstellung der Alkylphospho-oligoglycerine dagegen ist einfach, da in diesem Fall die entsprechenden Alkohole nach gegebenem Phosphorylierungsschema umgesetzt werden. Für die

Darstellung der ungesättigten Vertreter muß allerdings die Tetrahydropyranylschutzgruppe anstelle der Benzylschutzgruppe verwendet werden.

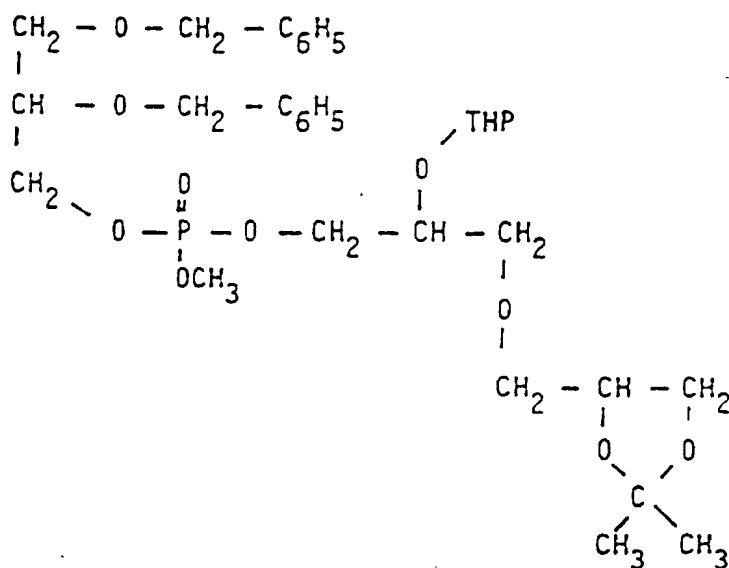
- 5 Für die Synthese der ungesättigten Vertreter dieser Stoffklasse eine grundsätzlich andere Strategie beschrieben werden. Hier erfolgt die Phosphorylierung von 1.2-Dibenzyl-sn-glycerin in der beschriebenen Weise (siehe dazu auch die deutsche Patentanmeldung DE 32 39 817), dann schließt sich die
 10 Umsetzung mit einem tetrahydropyranyl-geschützten Oligoglycerin an. Anstelle der Hydrolyse wird eine Methanolyse durchgeführt, wobei Phosphorsäuretriester erhalten werden, z.B. für 2-O-Tetrahydropyranyl-rac-G₁-1.3-0.0-1.2-isopropyliden-rac-G₂;

15

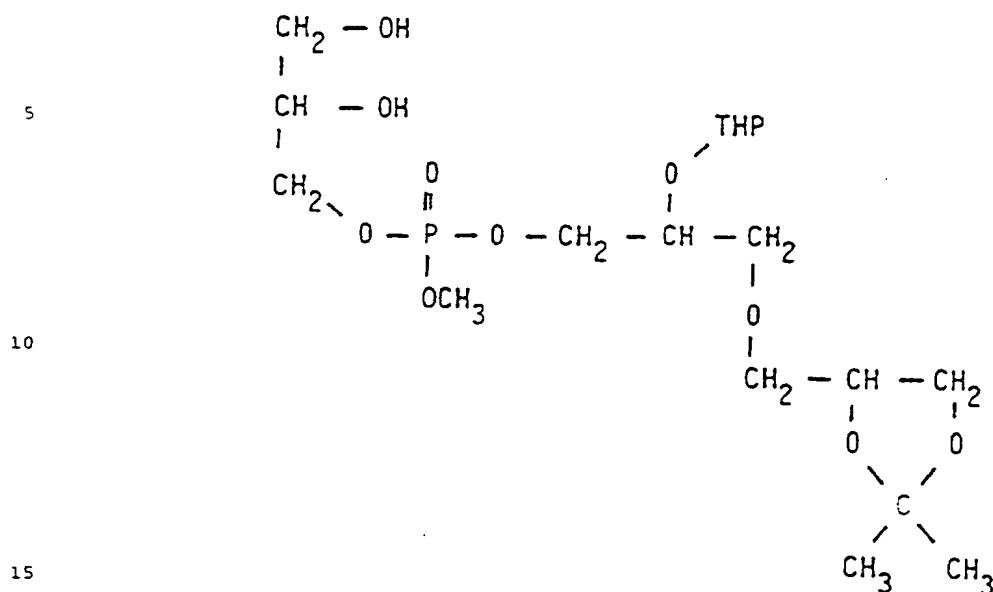
20

25

30

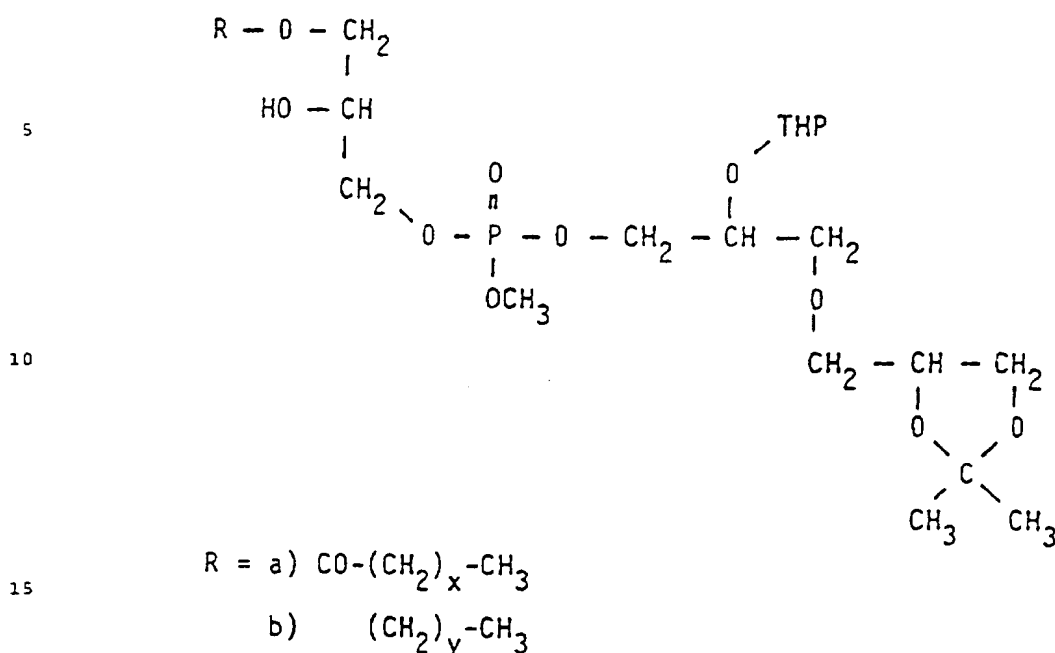


Dieses zentrale Zwischenprodukt wird nun mit Pd/C (5 % auf Aktivkohle) einer Hydrogenolyse unterworfen. Man erhält:



Es können nun beliebige ungesättigte und auch gesättigte Fettsäuren in die Positionen sn-1 und sn-2 des Glycerinmoleküls eingeführt werden. Danach erfolgt, wie in unserer früheren Patentanmeldung beschrieben, die Abspaltung der Methylgruppe mit LiBr und danach die Hydrolyse der Isopropyliden- und Tetrahydropyranylschutzgruppen in 70 %-iger Essigsäure bei 60 bis 70 °C. Die Dioleoylverbindungen kristallisieren schwer und müssen deshalb durch Chromatographie gereinigt werden, während die Dierucylverbindungen bereits gut in kristalliner Form erhalten werden können.

Auch zur Herstellung der gemischtkettigen Phosphatidyl-oligo-
glycerine ist die Phosphorsäuretriester-Strategie empfehlens-
wert. In diesem Falle werden wie bei der Synthese der Lyso-
30 phosphatidyl-oligoglycerine die 1-Acyl-2-O-benzyl-sn-glycerine
oder die 1-O-Alkyl-2-O-benzyl-sn-glycerine als Ausgangspro-
dukte verwendet und analog zu 1.2-Dibenzyl-sn-glycerin umge-
setzt. In diesem Falle erhält man als Zwischenprodukte nach
35 katalytischer Debenzylierung für die G₂-Verbindung:



Nun können in die freie sn-2-Position ungesättigte Fettsäuren
 20 eingeführt werden und diese Moleküle wie beschrieben von ihren
 Schutzgruppen befreit werden. Angenehm ist, daß Moleküle mit
 der Fettsäurekombination 1-Palmitoyl-2-oleoyl- oder 1-
 Stearoyl-2-oleoyl bereits gut kristallisieren.

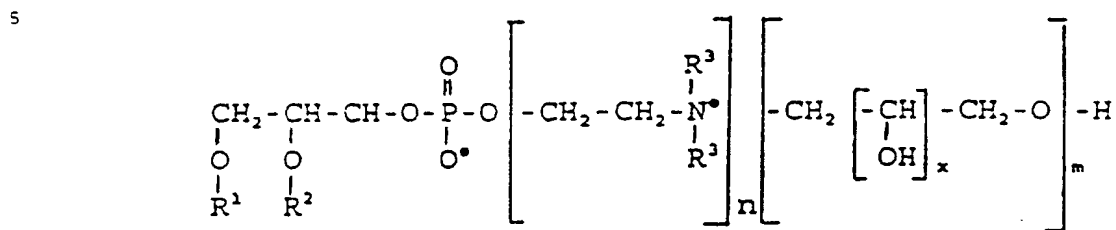
25 Beispiel 5: Weitere Eigenschaften

Mit steigender Anzahl der Glycerinmoleküle wächst die Anzahl
 der freien Hydroxylgruppen und damit die Polarität. Bei einem
 Anteil von 5 % in Wasser bildet PP-G-PG₄ als einziges PP-G-PG_n
 30 eine klare isotrope Lösung. Die Lipide PP-G-PG₁, PP-G-PG₂ und
 PP-G-PG₃ lösen sich beim Erwärmen über 40 °C in Wasser und
 bilden Überstrukturen. Nach Unterschreiten dieser Temperatur
 bilden sich mit unterschiedlich ausgeprägten Hysterese
 lamellare Strukturen, die durch Anisotropie (Doppelbrechung im
 35 polarisierten Licht) erkennbar sind. Die PP-G-PG₁-Lösung trübt
 sich am schnellsten und überschüssiges Lipid fällt nach
 Stehenlassen bei Raumtemperatur aus. Die lamellaren Phasen von
 PP-G-PG₂ und PP-G-PG₃ bleiben auch bei niedrigen Temperaturen

(bis 4 °C) stabil. Während der Übergang von der isotropen in die anisotrope Phase bei Raumtemperatur für PP-G-PG₂ nach einigen Minuten erkennbar wird, erfordert dies für PP-G-PG₃ mehrere Stunden. Die Unterschiede in der Polarität äußern sich s auch in verschiedenen Retentionsfaktoren (Rf-Wert) im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel.

Patentansprüche

1. Verbindung einer allgemeinen Formel (A)



worin R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasserstoff, einen gesättigten oder ungesättigten Alkyl- oder Acylrest darstellen, der gegebenenfalls verzweigt oder/und substituiert sein kann, R^3 Wasserstoff oder einen Alkylrest darstellt,

$n = 0$ oder 1 ist,

x eine ganze Zahl von 1 bis 4 darstellt und

m eine ganze Zahl von 2 bis 10 , falls $n = 0$, oder eine ganze Zahl von 1 bis 10 , falls $n = 1$, darstellt sowie 1 ist, falls x größer als 1 ist,

wobei im Falle $n = 0$ die Verbindung hinsichtlich des Werts von m größer als 90% einheitlich ist.

2. Verbindung nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet,

daß im Falle $n = 0$ die Verbindung hinsichtlich des Werts von m größer als 95% einheitlich ist.

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet,

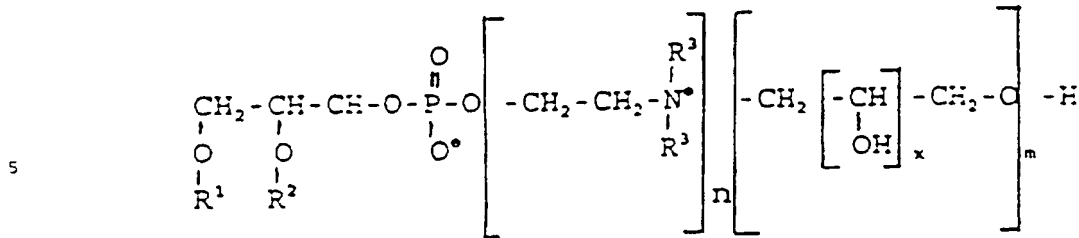
daß im Falle $n = 0$ die Verbindung hinsichtlich des Werts von m größer als 99% einheitlich ist.

4. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3,

dadurch gekennzeichnet,

daß $x = 1$ ist und m eine ganze Zahl von 2 bis 5 darstellt.

5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß $x = 1$ ist und m eine ganze Zahl von 2 bis 4 dar-
stellt.
- 5 6. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Formel (A) R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasser-
stoff, einen gesättigten oder ungesättigten C_1 - C_{24} -Alkyl-
10 oder C_1 - C_{24} -Acylrest darstellen.
7. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Phospho-rac-(1 oder 3)-oligoglycerinverknüpfung
15 vorliegt.
8. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Phospho-sn-1-oligoglycerinverknüpfung vorliegt.
- 20 9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Phospho-sn-3-oligoglycerinverknüpfung vorliegt.
- 25 10. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens einer der Reste R^1 und R^2 einen Acylrest
darstellt.
- 30 11. Liposomen,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie Phospholipide oder/und Alkylphospholipide, gege-
benenfalls Cholesterin und 1 bis 50 Mol-% einer Verbin-
dung der allgemeinen Formel (A)
- 35



oder deren Salze enthalten, wobei das Cholesterin, die Phospholipide, die Alkylphospholipide und die Verbindung der Formel (A) zusammen 100 Mol-% ergeben, worin R¹ und R² unabhängig voneinander Wasserstoff, einen gesättigten oder ungesättigten Alkyl- oder Acylrest darstellen, der gegebenenfalls verzweigt oder/und substituiert sein kann, R³ Wasserstoff oder einen Alkylrest darstellt,

15 $n = 0$ oder 1 ist,

x eine ganze Zahl von 1 bis 4 darstellt und

m eine ganze Zahl von 2 bis 10, falls $n = 0$, oder eine ganze Zahl von 1 bis 10, falls $n = 1$, darstellt sowie 1 ist, falls x größer als 1 ist, wobei im Falle $n = 0$ die Verbindung (A) hinsichtlich des Werts von m größer als 90 % einheitlich ist.

12. Liposomen nach Anspruch 11,

dadurch gekennzeichnet,

25 daß im Falle $n = 0$ die Verbindung (A) hinsichtlich des
Werts von m größer als 95 % einheitlich ist.

13. Liposomen nach Anspruch 11 oder 12,

dadurch gekennzeichnet,

30 daß im Falle $n = 0$ die Verbindung (A) hinsichtlich des Werts von m größer als 99 % einheitlich ist.

14. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 13,

dadurch gekennzeichnet,

35 daß sie 5 bis 15 Mol-% der Verbindung der Formel (A) enthalten, wobei das Cholesterin, die Phospholipide, die Alkylphospholipide und die Verbindung der Formel (A) zusammen 100 Mol-% ergeben.

15. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Formel (A) $x = 1$ ist und m eine ganze Zahl von 2
bis 5 darstellt.
- 5
16. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Formel (A) $x = 1$ ist und m eine ganze Zahl von 2
bis 4 darstellt.
- 10
17. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Formel (A) R^1 und R^2 unabhängig voneinander Wasser-
stoff, einen gesättigten oder ungesättigten C_1 - C_{24} -Alkyl-
oder C_1 - C_{24} -Acylrest darstellen.
- 15
18. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Verbindung der Formel (A) eine Phospho-rac-(1
oder 3)-oligoglycerinverknüpfung aufweist.
- 20
19. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Verbindung der Formel (A) eine Phospho-sn-1-oli-
goglycerinverknüpfung aufweist.
- 25
20. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Verbindung der Formel (A) eine Phospho-sn-3-oli-
goglycerinverknüpfung aufweist.
- 30
21. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Formel (A) mindestens einer der Reste R^1 und R^2
eine Acylgruppe darstellt.
- 35

22. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Formel (A) $n = 0$ ist.
- 5 23. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie eine negative Überschußladung aufweisen.
- 10 24. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß in Formel (A) $n = 1$ ist.
- 15 25. Liposomen nach Anspruch 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie keine Überschußladung aufweisen.
26. Liposomen nach Anspruch 24,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß sie eine positive Überschußladung aufweisen.
27. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie 0 bis 70 Mol-% Cholesterin, 1 bis 50 Mol-% einer
25 Verbindung der allgemeinen Formel (A), wobei $n = 1$ ist,
und Phospholipide oder/und Alkylphospholipide enthalten,
wobei diese Bestandteile zusammen 100 Mol-% ergeben.
- 30 28. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 26,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie 0 bis 70 Mol-% Cholesterin, 1 bis 15 Mol-% einer
Verbindung der allgemeinen Formel (A), wobei $n = 0$ ist,
und Phospholipide oder/und Alkylphospholipide enthalten,
wobei diese Bestandteile zusammen 100 Mol-% ergeben.
- 35 29. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 28,
dadurch gekennzeichnet,

daß sie 25 bis 43 Mol-% Cholesterin, 5 bis 15 Mol-% einer Verbindung der allgemeinen Formel (A) und Phospholipide oder/und Alkylphospholipide enthalten.

- 5 30. Liposomen nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie 38 bis 42 Mol-% Cholesterin enthalten.
31. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 30,
10 **dadurch gekennzeichnet,**
daß der Rest $-CH_2(-CHOH)_x-CH_2-OH$ von Zuckeralkoholen stammt, die für $x = 2$ vier Hydroxylgruppen, für $x = 3$ fünf Hydroxylgruppen und für $x = 4$ sechs Hydroxylgruppen aufweisen.
- 15 32. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 31,
dadurch gekennzeichnet,
daß sich nach 6 Stunden mehr als 50 % der zugegebenen Liposomenmenge im Blut befinden.
- 20 33. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 32,
dadurch gekennzeichnet,
daß sich nach 6 Stunden mehr als 60 % der zugegebenen Liposomenmenge im Blut befinden.
- 25 34. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 33,
dadurch gekennzeichnet,
daß ihre Halbwertszeit in Blut mindestens 10 h beträgt.
- 30 35. Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 34,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie zusätzlich einen oder mehrere pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.
- 35 36. Pharmazeutische Zusammensetzung,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 35 und in den Liposomen eingeschlossen einen oder mehrere

pharmazeutische Wirkstoffe gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Verdünnungs-, Hilfs-, Träger- und Füllstoffen enthält.

- 5 37. Verfahren zur Herstellung von Liposomen nach einem der Ansprüche 11 bis 35,

dadurch gekennzeichnet,

daß man 1 bis 50 Mol-% einer Verbindung der allgemeinen Formel (A) mit den weiteren Bestandteilen der Liposomen
10 in einer Menge, die zusammen mit der Verbindung der Formel (A) 100 Mol-% ergibt, in eine Lipidsuspension überführt und die Lipidsuspension dann durch geeignete Maßnahmen auf an sich bekannte Weise in Liposomen überführt.

- 15 38. Verfahren nach Anspruch 37,

dadurch gekennzeichnet,

daß man 5 bis 15 Mol-% einer Verbindung der allgemeinen Formel (A) mit 35 bis 43 Mol-% Cholesterin und 42 bis 60 Mol-% Phospholipide oder/und Alkylphospholipide in eine
20 Lipidsuspension überführt und die Lipidsuspension dann durch geeignete Maßnahmen auf an sich bekannte Weise in Liposomen überführt.

39. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung nach Anspruch 36,

25 **dadurch gekennzeichnet,**

daß man nach einem Verfahren gemäß Anspruch 37 oder 38 arbeitet und zum Einschluß wasserunlöslicher Wirkstoffe den Wirkstoff zusammen mit den Lipidbestandteilen löst
30 und zum Einschluß wasserlöslicher Wirkstoffe den Lipidfilm mit einer wäßrigen Lösung versetzt, die den wasserlöslichen Wirkstoff enthält.

40. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, worin n gleich 1 ist,

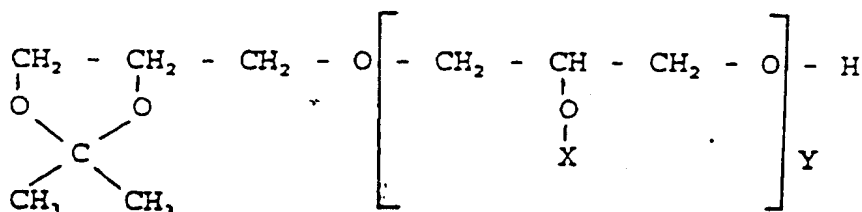
35 **dadurch gekennzeichnet,**

daß ein definiertes Oligoglycerin über die Aminogruppe mit einem Phosphatidylethanolamin verknüpft wird.

41. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, worin n gleich 0 ist,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein definiertes Oligoglycerin mit einem Phosphatidyl-
glycerin verknüpft wird.
42. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein definiertes Oligoglycerin oder ein C_4 - C_6 -Zucker-alkohol unter Verwendung eines Phosphorylierungsmittels an einen Alkohol der Formel $CH_2OR^1-CHOR^2-CHOH$ angehängt wird, wobei R^1 und R^2 die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben.
43. Verfahren nach Anspruch 42,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Phosphorylierungsmittel $POCl_3$ verwendet wird.
44. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 43,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Phospho-rac-(1 oder 3)-oligoglycerinverknüpfung gebildet wird.
45. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 43,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine stereospezifische Verbindung gebildet wird.
46. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 43 und 45,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Phospho-sn-1-oligoglycerinverknüpfung gebildet wird.
47. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 43 und 45,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine Phospho-sn-3-oligoglycerinverknüpfung gebildet wird.

48. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 47,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein lineares Oligoglycerin definierter Kettenlänge
eingesetzt wird.

49. Geschütztes Oligoglycerin der Formel (B)



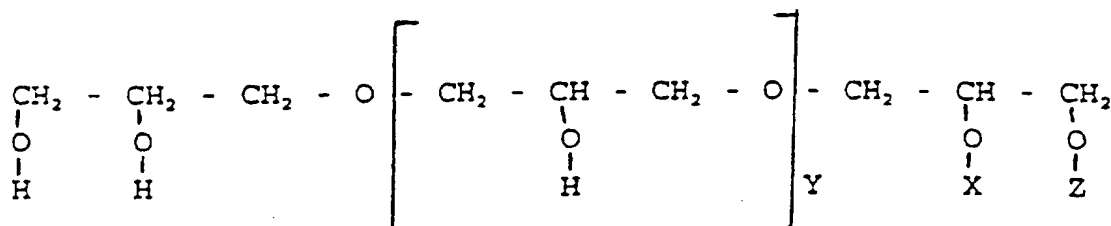
worin Y eine ganze Zahl von 1 bis 9 und X eine Benzyl-,
Alkyl- oder Tetrahydropropanylgruppe darstellt.

50. Geschütztes Oligoglycerin nach Anspruch 49,
dadurch gekennzeichnet,
daß Y eine ganze Zahl von 1 bis 3 darstellt.

51. Geschütztes Oligoglycerin nach Anspruch 49 oder 50,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich um eine einheitliche Verbindung definierter
Struktur handelt.

52. Verwendung eines geschützten Oligoglycerins nach Anspruch
49 bis 51 zur Herstellung einer Verbindung der Formel
(A).

53. Alkyloligoglycerin der Formel (C)



worin Y eine ganze Zahl von 0 bis 8 darstellt und einer der Reste X oder Z einen gesättigten oder ungesättigten Alkylrest und der andere der Reste Wasserstoff darstellt.

5 54. Alkyloligoglycerin nach Anspruch 53,

dadurch gekennzeichnet,

daß Y eine ganze Zahl von 1 bis 3 darstellt.

55. Alkyloligoglycerin nach Anspruch 53 oder 54,

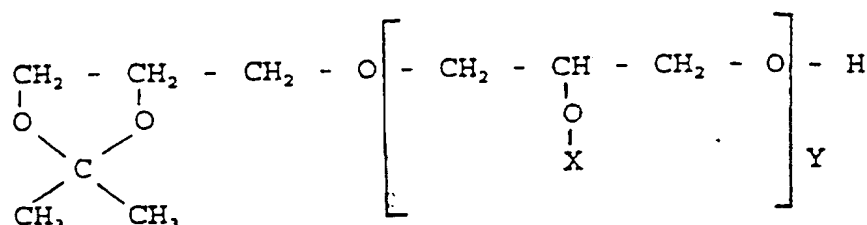
10 dadurch gekennzeichnet,

daß es sich um eine einheitliche Verbindung definierter Struktur handelt.

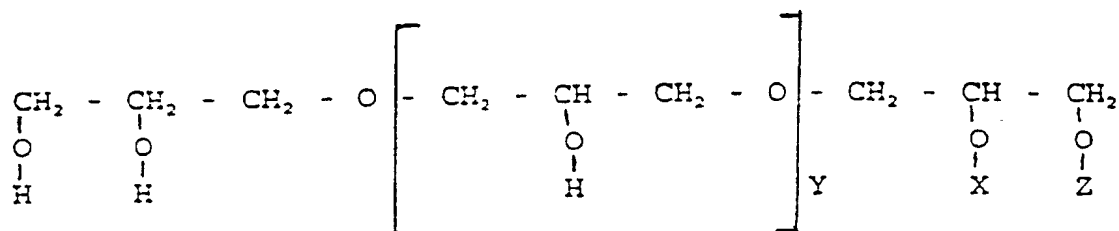
15

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 28. Juli 1997 (28.07.97) eingegangen;
ursprüngliche Ansprüche 49 und 53 geändert; alle
weiteren Ansprüche unverändert (1 Seite)]

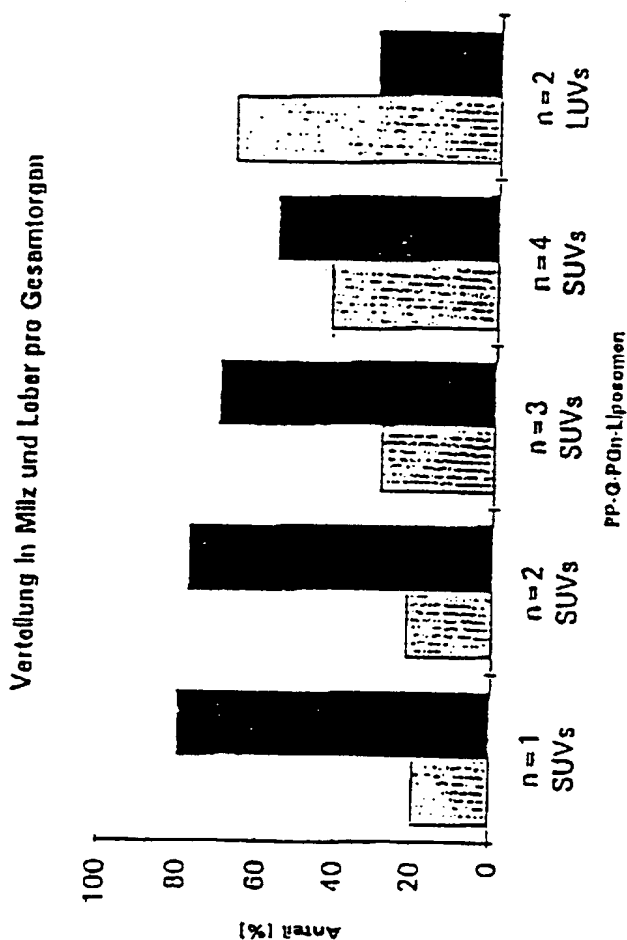
49. Geschütztes Oligoglycerin der Formel (B)

worin Y eine ganze Zahl von 1 bis 9 und X eine Benzylgruppe, eine Alkylgruppe mit mindestens 2 C-Atomen oder Tetrahydropropanylgruppe darstellt.

53. Alkyloligoglycerin der Formel (C)

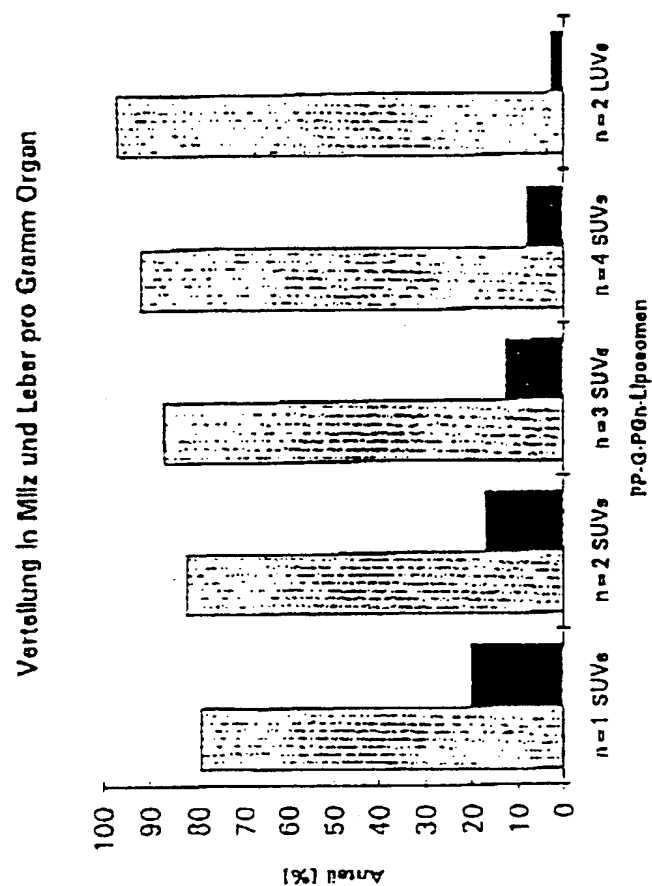
worin Y eine ganze Zahl von 1 bis 8 darstellt und einer der Reste X oder Z einen gesättigten oder ungesättigten Alkylrest und der andere der Reste Wasserstoff darstellt.

1/3



Figur 1: Die Verteilung der Liposomen über die Organe wurde 72 Stunden nach i.v.-Gabe bestimmt. Helle Balken, Milz; dunkle Balken, Leber; SUVs, small unilamellar liposomes mit dem Durchmesser von ungefähr 60 nm; LUVs, large unilamellar liposomes mit dem Durchmesser von ungefähr 190 nm.

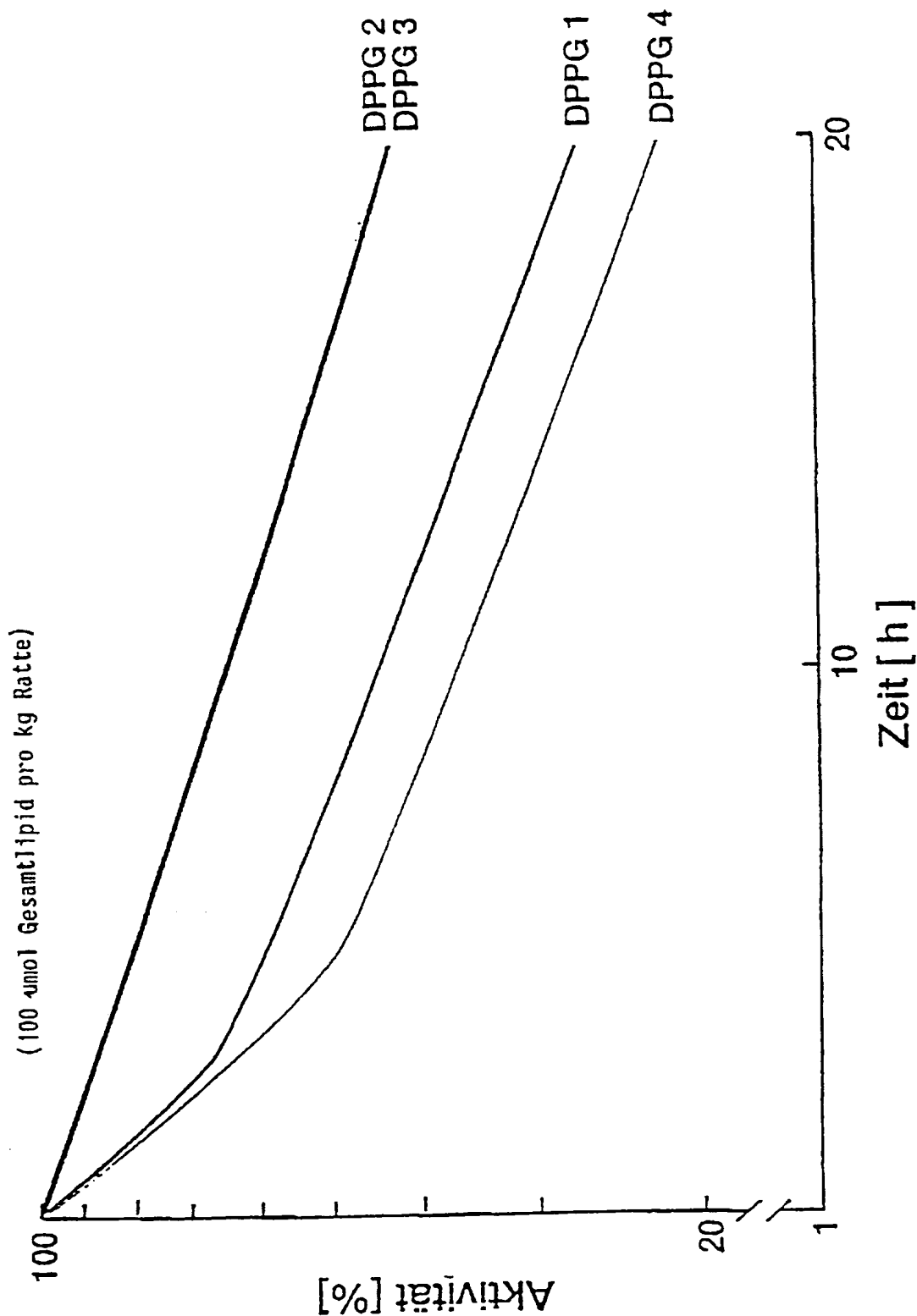
2/3



Figur 2: Legende siehe Abb. 1

3/3

Vergleich: Blutspiegelkurvenverlauf



Figur 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/00749

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C07F9/10 A61K9/127 C07D317/22 C07C43/13

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07F A61K C07D C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	INT. J. PHARM. (IJPHDE,03785173);94; VOL.111 (1); PP.103-7, FACULTY OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, TEIKYO UNIVERSITY, SAGAMIKO;KANAGAWA; 199-01; JAPAN (JP), XP000672277 MARUYAMA K ET AL: "Phosphatidyl polyglycerols prolong liposome circulation in vivo" cited in the application see the whole document ---	1-48
A	DD 240 020 A (KARL-MARX-UNIVERSITÄT LEIPZIG) 15 October 1986 see the whole document ---	1-10, 40-48
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 June 1997

Date of mailing of the international search report

24-06-1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Beslier, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCI, EP 97/00749

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, vol. 2, no. 3, 1 January 1992, pages 289-305, XP000303894 ALLEN T M: "STEALTH LIPOSOMES: FIVE YEARS ON" see the whole document ---	1-48
X	TETRAHEDRON (TETRAB,00404020);95; VOL.51 (16); PP.4732-32, INDIAN INST. TECHNOLOGY;DEP. CHEM.; BOMBAY; 400 076; INDIA (IN), XP000674272 BAIG M H A ET AL: "Stereoselective total synthesis of (2R,2'S,3Z)-1'-O-(2-methoxy-3-he xadecenyl)glycerol and (2R,2'S)-1'-O-(2-methoxyhexadecyl)glycerol - potential antitumor compounds from shark liver oil" see page 4725, compounds 10, 11 and page 4729 ---	49-55
X	EP 0 071 019 A (KAO SOAP CO.) 9 February 1983 see examples 1-3 ---	49-52
X	DE 36 19 883 A (L'OREAL) 18 December 1986 see page 33 ---	53-55
A	DE 34 27 093 A (KAO CORP.) 7 February 1985 see the whole document -----	49-55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT, EP 97/00749

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DD 240020 A		NONE	
EP 71019 A	09-02-83	JP 1515898 C	24-08-89
		JP 58013530 A	26-01-83
		JP 63066297 B	20-12-88
		AT 7688 T	15-06-84
		CA 1212680 A	14-10-86
		US 4504464 A	12-03-85
DE 3619883 A	18-12-86	LU 85952 A	13-01-87
		FR 2586017 A	13-02-87
		GB 2176481 A,B	31-12-86
		GB 2218096 A,B	08-11-89
		GB 2221682 A,B	14-02-90
		GB 2221683 A	14-02-90
		US 5008406 A	16-04-91
		US 5164488 A	17-11-92
		US 4827003 A	02-05-89
DE 3427093 A	07-02-85	JP 1665620 C	19-05-92
		JP 3031186 B	02-05-91
		JP 60028944 A	14-02-85
		FR 2549826 A	01-02-85
		GB 2144122 A,B	27-02-85
		HK 44290 A	15-06-90
		US 4576967 A	18-03-86

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 C07F9/10 A61K9/127 C07D317/22 C07C43/13

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07F A61K C07D C07C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	INT. J. PHARM. (IJPHDE,03785173);94; VOL.111 (1); PP.103-7, FACULTY OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, TEIKYO UNIVERSITY, SAGAMI-KO;KANAGAWA; 199-01; JAPAN (JP), XP000672277 MARUYAMA K ET AL: "Phosphatidyl polyglycerols prolong liposome circulation in vivo" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-48
A	DD 240 020 A (KARL-MARX-UNIVERSITÄT LEIPZIG) 15.Oktob. 1986 siehe das ganze Dokument ---	1-10, 40-48
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- * "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - * "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - * "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - * "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - * "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Juni 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

24-06-1997

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Beslier, L

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH, Bd. 2, Nr. 3, 1. Januar 1992, Seiten 289-305, XP000303894 ALLEN T M: "STEALTH LIPOSOMES: FIVE YEARS ON" siehe das ganze Dokument ---	1-48
X	TETRAHEDRON (TETRAB,00404020);95; VOL.51 (16); PP.4732-32, INDIAN INST. TECHNOLOGY;DEP. CHEM.; BOMBAY; 400 076; INDIA (IN), XP000674272 BAIG M H A ET AL: "Stereoselective total synthesis of (2R,2'S,3Z)-1'-O-(2-methoxy-3-he xadecenyl)glycerol and (2R,2'S)-1'-O-(2-methoxyhexadecyl)glycerol - potential antitumor compounds from shark liver oil" siehe Seite 4725, Verbindungen 10,11 und Seite 4729 ---	49-55
X	EP 0 071 019 A (KAO SOAP CO.) 9. Februar 1983 siehe Beispiele 1-3 ---	49-52
X	DE 36 19 883 A (L'OREAL) 18. Dezember 1986 siehe Seite 33 ---	53-55
A	DE 34 27 093 A (KAO CORP.) 7. Februar 1985 siehe das ganze Dokument -----	49-55

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT, EP 97/00749

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DD 240020 A		KEINE	
EP 71019 A	09-02-83	JP 1515898 C	24-08-89
		JP 58013530 A	26-01-83
		JP 63066297 B	20-12-88
		AT 7688 T	15-06-84
		CA 1212680 A	14-10-86
		US 4504464 A	12-03-85
DE 3619883 A	18-12-86	LU 85952 A	13-01-87
		FR 2586017 A	13-02-87
		GB 2176481 A,B	31-12-86
		GB 2218096 A,B	08-11-89
		GB 2221682 A,B	14-02-90
		GB 2221683 A	14-02-90
		US 5008406 A	16-04-91
		US 5164488 A	17-11-92
		US 4827003 A	02-05-89
DE 3427093 A	07-02-85	JP 1665620 C	19-05-92
		JP 3031186 B	02-05-91
		JP 60028944 A	14-02-85
		FR 2549826 A	01-02-85
		GB 2144122 A,B	27-02-85
		HK 44290 A	15-06-90
		US 4576967 A	18-03-86